

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID  
FACULTAD DE MEDICINA  
DEPARTAMENTO DE ANATOMÍA, HISTOLOGÍA Y  
NEUROCIENCIA

**ANATOMÍA DE LOS CIRCUITOS NEURONALES QUE CONTROLAN  
EL TRICEPS BRAQUIAL Y SU MODIFICACIÓN TRAS UNA LESIÓN  
MEDULAR**

Memoria presentada por el Licenciado:

**ANA MARÍA LUCAS OSMA**

para optar al grado de:

**DOCTOR EN NEUROCIENCIAS**

Director de la Tesis:

**JORGE EDUARDO COLLAZOS CASTRO**

Laboratorio de Reparación Neural y Biomateriales

Hospital Nacional de Paraplégicos

España

Toledo, 2011

COMISIÓN DE DOCTORADO  
Universidad Autónoma de Madrid

**Jorge E. Collazos Castro, MD-PhD, Jefe del Laboratorio de Reparación Neural y Biomateriales del Hospital Nacional de Paraplégicos (SESCAM), informa que:**

El trabajo de investigación propuesto como Tesis Doctoral por Dña. Ana María Lucas Osma, realizado bajo mi dirección y titulado: *“Anatomía de los circuitos neuronales que controlan el Tríceps braquial y su modificación tras una lesión medular”*, contiene las siguientes aportaciones originales:

1. Los fascículos del Tríceps braquial están inervados por subnúcleos motores independientes que difieren en tamaño y se entremezclan en la porción rostral de la columna de motoneuronas espinales. La parte caudal de la columna contiene neuronas que inervan mayoritariamente el fascículo largo.
2. El fascículo medial está formado predominantemente por fibras tipo 1 y unidades motoras pequeñas, el fascículo lateral tiene una gran cantidad de fibras tipo 2b y unidades motoras grandes y el fascículo largo contiene una mezcla más balanceada de tipos de fibras y tamaños de unidades motoras.
3. La hemisección medular en C6 causa desinervación masiva y persistente de los segmentos medulares en donde se encuentran los subnúcleos del Tríceps braquial, sin muerte transináptica de sus motoneuronas.
4. Existen alteraciones de las sinapsis sobre las motoneuronas del Tríceps braquial poco después de su axotomía, independientemente del subnúcleo considerado.
5. Existen numerosas entradas sinápticas al segmento C7 provenientes de neuronas propioespinales de los segmentos C1 a C5, con mayor representación en C3 / C4 y con particularidades en cada lado de la médula.

Este trabajo reúne todos los requisitos necesarios para ser defendido como tesis doctoral y se ha recogido en un artículo científico publicado y en otros que se encuentran en preparación. Por lo tanto, autorizo su defensa pública para la obtención del título de doctor.

Jorge E. Collazos Castro

Toledo, a 10 de Enero de 2011

## *AGRADECIMIENTOS*

En este apartado quisiera dar mi más sentido agradecimiento a todas las personas que de una u otra forma han contribuido a que esta tesis se pudiese llevar a cabo.

En primer lugar deseo hacer una mención especial al Prof. Dr. Manuel Nieto Sampedro a quien he tenido el gran honor y placer de conocer. Muchísimas gracias por brindarme la oportunidad de desarrollar mi tesis en esta Unidad de Investigación. Así mismo, quisiera agradecer a la Fundación del Hospital Nacional de paraplégicos (FUHNPAIN) y especialmente a D. Miguel Ángel Carrasco, la beca que la fundación me concedió para llevar a cabo este trabajo. Y por supuesto, al Dr. Jorge E. Collazos Castro quien ha dirigido mi trabajo y es participe activo del mismo. Ha sido un verdadero placer formar parte del grupo de trabajo y agradezco el apoyo prestado en todo momento. Y muy especialmente quisiera agradecer a Isabel de Andrés el apoyo mostrado en todo momento y sus sabios consejos. Ha sido un placer que fuera mi tutora en la facultad. Dentro de la facultad, también quisiera recordar a Basilio. Gracias por todo.

A continuación me gustaría hacer referencia a todas aquellas personas con las que he compartido muy buenos momentos y han hecho mucho más agradable el día a día. Primero de forma muy especial, a toda la gente que algún momento ha pasado por el labo o sigue en él: Elisa, Moni, Noe, Berta, Josera, Ksenija, José Luis, Guillaume, Conchi, Gustavo, Gabriel (mi compañero de penurias) y Sandra (compañera de café que es aun mejor). De forma global a todos los miembros del resto de laboratorios por el buen ambiente creado (perdonadme que no os nombre a todos). Aunque debo de hacer una mención especial a dos grupos con los que he pasado más tiempo. Por un lado al grupo de función sensitivomotora, gracias por permitirme ocupar vuestro laboratorio esas largas horas de crióstato. Un placer estar con vosotros. Y, por supuesto, a mis chicos de Neurodesarrollo. Muchísimas gracias por acogerme y hacerme sentir una más del grupo. Lograsteis que las largas horas y horas de microscopio fueran mucho más amenas y divertidas.

Además, deseo agradecer muy especialmente su apoyo a “mis chicas de la limpieza” sois de lo mejor: Paqui, María, Pepi, Ana, Sole, Inma y, de forma muy especial, a Rocío. Sin olvidar a los chicos de la limpieza, Valentín, a los celadores de puerta (gracias a todos!!) y, en general, a todo el personal del hospital y de la cafetería.

Evidentemente hay muchos más a quienes quisiera y voy a agradecer el haber formado parte de la experiencia fantástica y apasionante que ha sido realizar esta Tesis y vivir en Toledo. Siempre pensé en escribir un largo manuscrito sobre mis aventuras y desventuras durante esta etapa, pero ahora que ha llegado el momento no lo he creído oportuno. Lo siento, porque me encantaría nombrar a muchas personas que han sido muy especiales para mí y demostrárselo. Aunque creo que no es necesario.

Sólo decir que el realizar este trabajo ha sido una de las experiencias más enriquecedoras de mi vida. Muchísimas gracias a todos!!!

<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 CONSIDERACIONES ANATÓMICAS Y FISIOLÓGICAS DEL MÚSCULO TRÍCEPS BRAQUIAL .....</b>	<b>2</b>
1.1.1 Generalidades estructurales de la musculatura estriada. Músculos fasciculados.....	2
1.1.2 Anatomía comparativa del Tríceps braquial.....	8
1.1.3 Aspectos funcionales del Tríceps braquial y su participación en los diferentes tipos de movimiento.....	10
<b>1.2 CONTROL NEURAL DE LA ACTIVACIÓN DEL TRÍCEPS BRAQUIAL. .....</b>	<b>12</b>
1.2.1 Anatomía evolutiva de las extremidades y el sistema nervioso.....	12
1.2.2 Médula espinal.....	16
1.2.3 Núcleo motor espinal y unidad motora.....	21
1.2.4 Topografía y reclutamiento de las MNs y sus implicaciones funcionales.....	22
1.2.5 Aspectos cuantitativos de las entradas sinápticas a un segmento medular.....	26
<b>1.3 CONSECUENCIAS DE UNA LESIÓN MEDULAR SOBRE LOS CIRCUITOS NEURONALES ESPINALES.....</b>	<b>27</b>
1.3.1 Cambios en la neurona axotomizada.....	29
1.3.2 Desinervación y muerte transneuronal.....	32
1.3.3 Crecimiento axonal y sinaptogénesis reactiva.....	33
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>35</b>
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>37</b>

<b>3.1</b>	<b>PROCEDIMIENTOS GENERALES.....</b>	<b>38</b>
<b>3.1.1.</b>	<b>Animales.....</b>	<b>38</b>
<b>3.1.2.</b>	<b>Anestesia y cuidados pre y post-operatorios.....</b>	<b>38</b>
<b>3.1.3</b>	<b>Sacrificio de los animales mediante perfusión por vía transcardiaca.....</b>	<b>39</b>
<b>3.1.4</b>	<b>Procesamiento histológico del tejido nervioso.....</b>	<b>40</b>
	<i>a) Tinción histológica con Hematoxilina-Eosina (H-E).....</i>	<i>40</i>
	<i>b) Revelado de trazador HRP.....</i>	<i>41</i>
	<i>c) Procesamiento inmunohistoquímico para sinaptofisina.....</i>	<i>42</i>
<b>3.1.5</b>	<b>Trazadores neuronales.....</b>	<b>43</b>
<b>3.1.6</b>	<b>Modelo de lesión de la ME.....</b>	<b>44</b>
<b>3.1.7</b>	<b>Cuantificación y procesamiento de las imágenes.....</b>	<b>46</b>
<b>3.1.8</b>	<b>Procesamiento estadístico de los datos.....</b>	<b>46</b>
<b>3.2</b>	<b>DISEÑOS EXPERIMENTALES Y CUANTIFICACIONES.....</b>	<b>47</b>
<b>3.2.1</b>	<b>Marcado retrógrado del núcleo motor del TB en la rata.....</b>	<b>47</b>
	<i>a) <u>Técnicas de marcaje retrógrado</u>.....</i>	<i>47</i>
	<i>    Por axotomía del nervio periférico.....</i>	<i>47</i>
	<i>    Por inyección intramuscular.....</i>	<i>50</i>
	<i>b) <u>Identificación de los subnúcleos motores</u>.....</i>	<i>50</i>
	<i>    Experimento 1: cuantificación de las MNs que inervan cada fascículo.....</i>	<i>50</i>
	<i>    Experimento 2: Distribución segmentaria de las MNs.....</i>	<i>51</i>
	<i>    Experimento 3: Medición de los perfiles neuronales de los.....</i>	<i>52</i>
	<i>        subnúcleos del TB.</i>	
	<i>c) <u>Metodología de cuantificación del número de MNs</u>.....</i>	<i>53</i>
	<i>    Cuantificación simple.....</i>	<i>53</i>
	<i>    Cuantificación del número absoluto de MNs.....</i>	<i>53</i>

	<i>Cuantificación estereológica.....</i>	<i>55</i>
<b>3.2.2</b>	<b>Comprobaciones relacionadas con los experimentos 1 y 2.....</b>	<b>57</b>
	<i>a) Marcaje simultáneo de dos trazadores.....</i>	<i>57</i>
	<i>b) Intercambio de trazadores.....</i>	<i>58</i>
	<i>c) Inyección intramuscular de AB.....</i>	<i>58</i>
	<i>d) Comprobación de asimetrías anatómicas entre el lado derecho e izquierdo.....</i>	<i>59</i>
<b>3.2.3</b>	<b>Análisis estructural del TB.....</b>	<b>59</b>
	<i>a) Extracción y congelación de los fascículos y del músculo completo.....</i>	<i>59</i>
	<i>b) Procesamiento histoquímico para ATPasa.....</i>	<i>60</i>
	<i>c) Tinción histológica de Van Gieson.....</i>	<i>60</i>
	<i>d) Clasificación, cuantificación y medición de las fibras musculares.....</i>	<i>61</i>
<b>3.3</b>	<b>MODIFICACIONES EN LOS CIRCUITOS NEURONALES DEL TB TRAS UNA LESIÓN MEDULAR.....</b>	<b>62</b>
<b>3.3.1</b>	<b>Supervivencia de las MNs del TB tras hemisección medular en C6.....</b>	<b>62</b>
	<i>a) Grupos de animales con lesión.....</i>	<i>62</i>
	<i>b) Grupo de animales control.....</i>	<i>63</i>
	<i>c) Procesamiento histológico.....</i>	<i>63</i>
	<i>d) Cuantificación.....</i>	<i>64</i>
<b>3.3.2</b>	<b>Cambios sinápticos de los segmentos cervicales tras hemisección en C6.....</b>	<b>64</b>
	<i>a) Procesamiento histológico.....</i>	<i>64</i>
	<i>b) Cuantificación y análisis.....</i>	<i>65</i>
<b>3.4</b>	<b>EFFECTO DE LA AXOTOMÍA DE LAS MNs SOBRE LAS AFERENCIAS SINÁPTICAS.....</b>	<b>66</b>

<b>3.5 MARCAJE RETRÓGADO DE LAS NEURONAS SUPRAESPINALES Y PROPIOESPINALES QUE PROYECTAN A C7.....</b>	<b>68</b>
<b>3.5.1 Técnica de inyección intramedular.....</b>	<b>68</b>
<b>3.5.2 Identificación y cuantificación de las neuronas que proyectan a C7.....</b>	<b>69</b>
<i>a) Aproximación inicial.....</i>	<i>69</i>
<i>b) Cuantificación y distribución segmentaria de las neuronas que proyectan al lado derecho de C7 desde los segmentos C1 a C4.....</i>	<i>69</i>
<i>c) Cuantificación de las neuronas marcadas en la láminas 7 y 8 de los segmentos C2 a C5.....</i>	<i>70</i>
<b>4 RESULTADOS.....</b>	<b>72</b>
<b>4.2 ANATOMÍA DEL NÚCLEO MOTOR DEL TB EN LA RATA.....</b>	<b>73</b>
<b>4.2.1 Cuantificación de las MNs que inervan cada fascículo.....</b>	<b>73</b>
<b>4.2.2 Distribución segmentaria de las MNs.....</b>	<b>76</b>
<b>4.2.3 Medición de los perfiles neuronales de los subnúcleos del TB.....</b>	<b>79</b>
<b>4.3 ADECUACIÓN DE LOS TRAZADORES .....</b>	<b>80</b>
<b>4.3.1 Marcaje simultáneo con dos trazadores.....</b>	<b>80</b>
<b>4.3.2 Intercambio de trazadores.....</b>	<b>81</b>
<b>4.3.3 Inyección intramuscular de AB.....</b>	<b>82</b>
<b>4.3.4 Estudio de las asimetrías anatómicas entre lados derecho e izquierdo.....</b>	<b>83</b>
<b>4.4 ANÁLISIS ESTRUCTURAL DEL TB.....</b>	<b>83</b>
<b>4.4.1 Proporción en peso y tamaño de los fascículos.....</b>	<b>85</b>
<i>a) Cuantificación del número de fibras musculares.....</i>	<i>85</i>
<b>4.4.2 Cálculo de la Tasa de Inervación.....</b>	<b>86</b>



4.4.3	Análisis de los tipos de fibras musculares por histoquímica para ATPasa.....	86
4.5	MODIFICACIONES EN LOS CIRCUITOS NEURONALES DEL TB TRAS UNA LESIÓN MEDULAR.....	87
4.5.1	Supervivencia de las MNs del TB tras hemisección medular en C6.....	87
4.5.2	Cambios sinápticos en los segmentos cervicales tras hemisección en C6.....	92
4.6	EFFECTO DE LA AXOTOMÍA DE LAS MNs SOBRE LA DENSIDAD SINÁPTICA AFERENTE.....	96
4.7	NEURONAS SUPRAESPINALES Y PROPIOESPINALES QUE PROYECTAN A C7.....	99
4.7.1	Aproximación cualitativa inicial.....	99
4.7.2	Cuantificación y distribución segmentaria global de las neuronas que proyectan al lado derecho de C7 desde C1 a C4.....	102
4.7.3	Cuantificación de las proyecciones desde las láminas 7 y 8 de los segmentos C2 a C5 hasta el lado derecho del segmento medular C7.....	103
5	DISCUSIÓN.....	106
5.1	COMPARTIMENTACIÓN NEUROMUSCULAR Y ARQUITECTURA DEL TB.....	108
5.2	TASA DE INERVACIÓN, TIPOS DE FIBRAS MUSCULARES EN EL TB Y SUS IMPLICACIONES FUNCIONALES.....	110
5.3	DESINERVACIÓN Y MUERTE TRANSINÁPTICA DESPUES DE HEMISECCIÓN MEDULAR EN C6.....	114
5.4	CAMBIOS RETROGRADOS TRAS AXOTOMIA DE LAS MOTONEURONAS DEL TB.....	116
5.5	NEURONAS PROPIOESPINALES CERVICALES QUE PROYECTAN A C7 EN LA RATA.....	117
5.6	CONSIDERACIONES METODOLOGICAS ADICIONALES.....	118

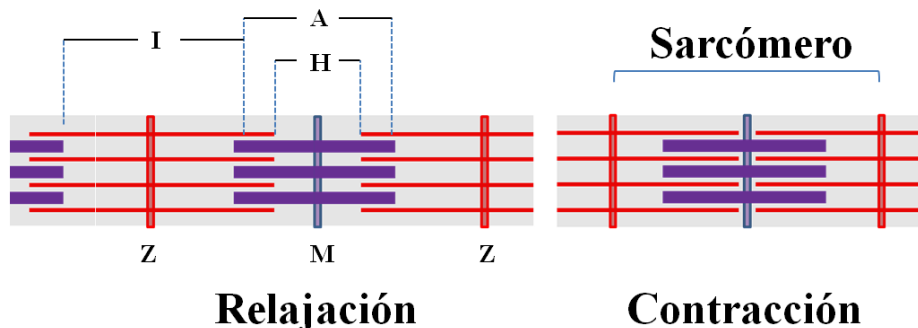
5.6.1	Técnicas de cuantificación de las MNs.....	118
5.6.2	Técnicas de trazado neuronal retrógrado.....	119
5.7	IMPLICACIONES EN EL ESTUDIO DE LA LESIÓN MEDULAR.....	119
6	CONCLUSIONES.....	121
7	BIBLIOGRAFÍA.....	123

## *1. Introducción*

## 1.1 CONSIDERACIONES ANATÓMICAS Y FISIOLÓGICAS DEL MÚSCULO TRÍCEPS BRAQUIAL.

### 1.1.1 Generalidades estructurales de la musculatura estriada. Músculos fasciculados.

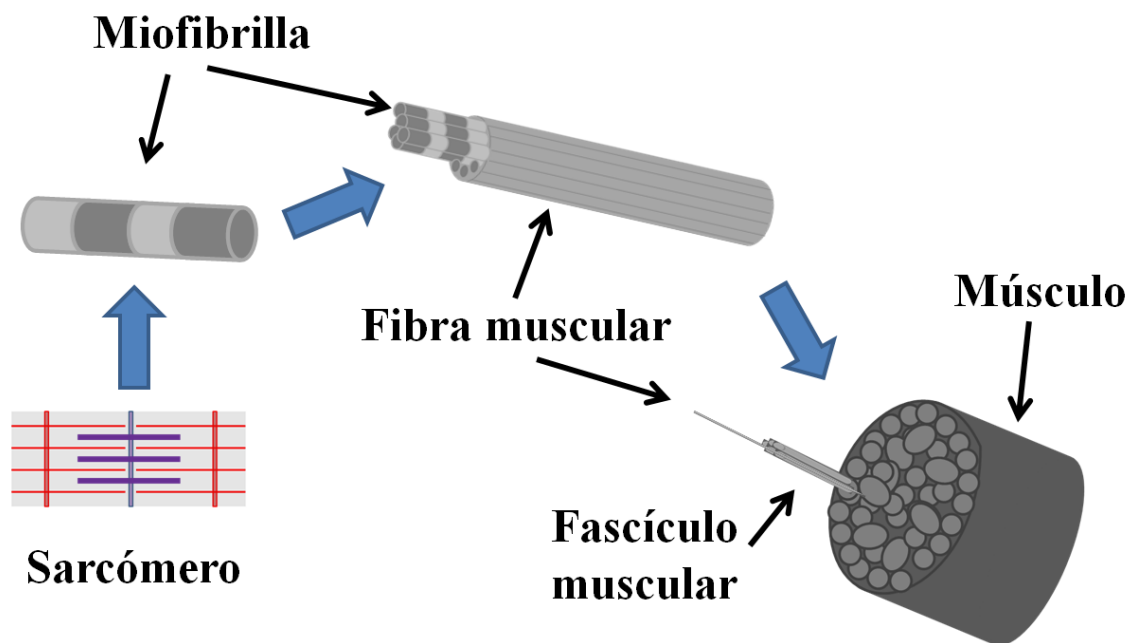
El músculo estriado es un órgano contráctil diseñado para generar fuerza que contribuye al mantenimiento de la postura y al movimiento y que, gracias a una gran versatilidad en su estructura y composición, puede participar en tareas muy distintas. Su estructura se organiza jerárquicamente, a partir de la agrupación ordenada de unidades más pequeñas. De esta forma, la unidad funcional de la contracción muscular es el *sarcómero* (Fig. 1.1) formado por dos tipos de polímeros de proteínas (un filamento grueso o *miosina* y un filamento delgado o *actina*) interpuestos a modo de una red hexagonal. El deslizamiento de los filamentos de actina sobre los de miosina produce un acortamiento de las fibras musculares que da como resultado la contracción muscular.



**Figura 1.1.** Estructura del sarcómero en relajación y contracción. Esquema de la disposición de los filamentos de actina (barras rojas horizontales) y miosina (barras moradas), cuyo solapamiento origina una apariencia bandeada que recibe diferentes nombres en función de las estructuras implicadas (bandas I, A y H, línea M y disco Z).

Los *sarcómeros* se disponen en serie formando las *miofibrillas*, unidas entre sí por proteínas de los filamentos intermedios (desmina y vimentina) que facilitan la transmisión mecánica de la fuerza (Lazarides 1980), y que se organizan en paralelo

formando una *fibra muscular*. La fibra muscular es una célula multinucleada de estructura cilíndrica rodeada por endomisio y con un diámetro comprendido entre 10 y 100  $\mu\text{m}$ . El diámetro de la fibra muscular puede modificarse por la actividad física y determina la fuerza que es capaz de generar, mientras que la velocidad de contracción y el acortamiento total están relacionados con la longitud de la fibra (Lieber 1998). Los paquetes de fibras se agrupan bajo una capa de perimisio dando lugar a los *fascículos musculares*. A su vez, los fascículos se agregan bajo el epimisio formando la entidad estructural que conocemos como *músculo* (Fig. 1.2).



**Figura 1.2.** Organización jerárquica del músculo estriado. El músculo estriado se constituye gracias a la agrupación de unidades más pequeñas que se ordenan progresivamente en estructuras de mayor tamaño.

Las *fibras musculares* están especializadas en términos fisiológicos (Burke y col. 1973) y metabólicos (Peter y col. 1972), así como en las isoformas de las cadenas pesadas de miosina que contienen (Schiaffino y col. 1989). En función del análisis realizado, podemos distinguir diferentes tipos de fibras que tienen una nomenclatura propia. En la Tabla 1.1 se muestran varios sistemas de clasificación en función del parámetro seleccionado.

	Espectro del tipo de fibra			Autores
	LO	ROG	RG	
<b>Metabólico</b>				Peter y col. 1972
<b>Morfológica y fisiológica</b>	roja lenta	blanco rápida	blanca rápida	Ranvier 1873
<b>Anchura de la línea Z</b>	roja	intermedia	blanca	Gauthier 1969
<b>Histoquímica</b>	III	II	I	Romanul 1964
<b>Histoquímica</b>	Tipo 1	Tipo 2A	Tipo 2B	Brooke y Kaiser 1972
<b>Inmunohistoquímica</b>	Tipo 1	Tipo 2A y 2X	Tipo 2B	Schiaffino y col. 1989

**Tabla 1.1.** *Sistemas de clasificación de las fibras musculares.* LO: oxidativa lenta; ROG: oxidativa glucolítica rápida; RG: glucolítica rápida. Tabla modificada a partir de Lieber R. L. *Estructura del músculo esquelético, función y plasticidad.* Lippincott Williams & Wilkins, 2002.

Cada uno de los métodos descritos muestra el contenido relativo de los distintos tipos de fibras para un determinado parámetro y no siempre se pueden correlacionar entre sí las clasificaciones. De todos ellos, vamos a hacer mención al sistema de clasificación basado en métodos histoquímicos que revelan las enzimas tisulares: *miosina ATPasa*, cuyas isoformas se relacionan con la velocidad de contracción; *succinato deshidrogenasa* (SDH), que refleja el potencial oxidativo relativo de las fibras musculares; y  *$\alpha$ -glicerofosfato deshidrogenasa* ( $\alpha$ -GP), que distingue las fibras en función del potencial glucolítico relativo. En base a la actividad de las 3 enzimas mencionadas distinguimos los siguientes tipos (Peter y col. 1972; Wells 2003):

- 1) *Fibras lentas y oxidativas* (LO); las de menor tamaño, se activan lentamente, generan poca fuerza pero son muy resistentes a la fatiga.
- 2) *Fibras rápidas oxidativas* (ROG); de mayor tamaño que las lentas, de respuesta más rápida y resistentes a la fatiga.
- 3) *Fibras rápidas glucolíticas* (RG); las de mayor tamaño. Se activan rápidamente

y son las que mayor tensión desarrollan pero tienen muy poca resistencia a la fatiga.

La actividad de la *miosina ATPasa* se relaciona directamente con la velocidad de contracción del músculo (Baraday 1967) y las fibras se clasifican en función de la rapidez de hidrólisis relativa del ATP. En 1970, Broke y Kaiser desarrollaron un esquema de clasificación basado en la ATPasa aprovechando el comportamiento que las isoformas de miosina muscular tienen en función del pH del medio. Estos investigadores observaron que a pH ácido las fibras lentas se tiñen más oscuras que las rápidas, mientras que a pH básico ocurre lo contrario. Siguiendo este principio y procesando el tejido a diferente pH se obtienen 3 tonalidades de color, que permiten diferenciar entre fibras lentas (tipo 1) y dos subtipos de fibras rápidas (tipo 2): 2A y 2B. Como se detalla en la Tabla 2.2.

pH de preincubación	Tipo 1	Tipo 2A	Tipo 2B
9.4	Claro	Oscuro	Oscuro
4.6	Oscuro	Claro	Medio
4.3	Oscuro	Claro	Medio

**Tabla 2.2.** Clasificación de las fibras musculares utilizando el análisis de la ATPasa (Brooke y Kaiser 1970). Tabla modificada a partir de Lieber R. L. *Estructura del músculo esquelético, función y plasticidad*. Lippincott Williams & Wilkins, 2002.

En ocasiones se establece una relación directa entre las clasificaciones de las fibras en LO, ROG, RG y en 1, 2A, 2B, respectivamente, aunque no existe evidencia de la misma. Parece que las fibras 1 tienen una alta actividad de enzimas oxidativas y pueden equivaler a las fibras tipo LO. Pero existe una gran variabilidad en la actividad aeróbica de los otros dos tipos de fibras; las fibras 2B se parecen más a las ROG y las 2A a las RG según la actividad SDH que presentan (Horäk 1983). Además, la reactividad de la ATPasa después de una pre-incubación a pH ácido (4.6) no sirve como indicador fiable de las fibras con capacidad oxidativa aeróbica. Por tanto, se pierde la

relación directa entre los dos sistemas de clasificación de las fibras, como demuestra un estudio realizado combinando las técnicas de ATPasa y SDH (Nemeth 1980).

En la mayoría de los músculos están presentes todos los tipos de fibras, aunque un análisis detallado de secciones transversales muestra que la distribución no es siempre uniforme ni homogénea. En el humano, los músculos del tronco con función postural (Gramsbergen 2005) y los extensores de las piernas tienen una mayor proporción de fibras lentas (Bottinelli y Reggiani 2000), mientras que en el resto de los músculos las fibras rápidas son más numerosas. Así, el 88% de las fibras del sóleo son tipo 1, mientras que en el esternocleidomastoideo su presencia se reduce a un 35% (Johnson y col. 1973). Además, las fibras musculares pueden distribuirse de forma diferente dentro del músculo (Kernell 1998), como ocurre en el flexor carpo radial (Gonyea y Ericson 1977), gastrocnemio (Peters y col. 1984) y tibial anterior (Pullen 1977). El grado de regionalización en músculos homólogos varía según la especie animal (Wang y Kernell 2001a), el sexo (Widmer y col. 2007) o entre individuos de misma especie y sexo (Johnson y col. 1973). Existe una íntima relación entre la actividad física y la composición de las fibras musculares. Recíprocamente, la proporción y distribución de los diferentes tipos de fibras va a definir la capacidad funcional del músculo para una determinada tarea. De esta forma, el mantenimiento de la postura se lleva a cabo por la activación de fibras lentas, que generan poca fuerza pero mantenida en el tiempo y que necesitan poca energía para contraerse (He y col. 2000); mientras que en los movimientos de mucha intensidad se activan fibras musculares rápidas, que generan mucha fuerza pero con un elevado gasto metabólico (He y col. 2000). La composición estructural de un músculo no es inmutable y puede ser modificada en función de la actividad desarrollada (Wang y Kernell 2001b). De hecho, el músculo esquelético es uno de los tejidos más plásticos (adaptables) del cuerpo (Lieber 1998) y factores como la estructura, la distribución de los tipos de fibra, la longitud del tendón, el diámetro de la fibra y la distribución mitocondrial pueden cambiar en función de la estimulación recibida. De forma general, con el aumento del uso del músculo sus fibras se vuelven más “lentas” y resistentes a la fatiga, mientras que una menor utilización por desinervación, tenotomía o lesión de la médula espinal (ME) se acompaña de atrofia, disminución en la capacidad de generar fuerza y conversión de



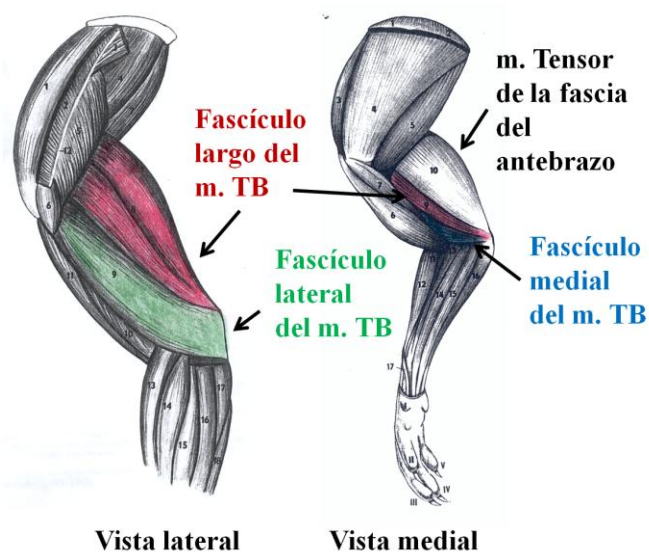
fibras lentas a rápidas. El grado de modificación es proporcional al cambio en el uso que experimenta el músculo. Los músculos antigravitatorios utilizados con más frecuencia se atrofian más que sus antagonistas de menor uso (Hauschka y col. 1987; Roy y col. 1987).

Si bien es cierto que el tipo de fibra determina la función muscular, esta también está influida considerablemente por la estructura anatómica. La clasificación de los músculos puede hacerse en base a parámetros estructurales como la forma (*largo, ancho, corto, fusiforme, aplanado*), características del vientre muscular (*digástrico, poligástrico*), arquitectura muscular o disposición de las fibras en relación al eje de generación de la fuerza (*penniforme, bipenniforme, circumpenniforme y multipenniforme*). Asimismo, existen músculos compuestos por dos, tres o cuatro porciones anatómicamente distinguibles y que se denominan *bíceps, tríceps* o *cuádriceps*, respectivamente. Estos últimos se caracterizan por compartir un punto común de unión al hueso y otro extremo de anclaje independiente, como los músculos tríceps y bíceps braquial, que rompen con la idea tradicional del músculo como una entidad única. De hecho, pocos músculos como el sóleo *-que presentan una estructura histoquímica homogénea, de arquitectura peniforme, con origen e inserción simple, y está inervado por una única rama y sin planos internos de fascia-* pueden cumplir los requisitos para ser considerados y comportarse como una entidad única (Binder y Mendell 1990; Wang y Kernell 2001b). Uno de los trabajos pioneros en demostrar que los músculos multipeniformes no siempre se comportan como una unidad lo realizó Cohen en 1953, quien consiguió activar el recto femoral independientemente del resto de cabezas del cuádriceps femoral en el gato durante el reflejo de estiramiento. De hecho, muchos músculos en los mamíferos están divididos en porciones que, a pesar de no tener ninguna subdivisión anatómicamente visible, desempeñan funciones diferentes y pueden ser activados de forma independiente. Esto se ha demostrado para el sartorio y el tensor la fascia lata (Gordon y col. 1991), gastrocnemio (English y col. 1993) y diafragma (Gordon y Richmond 1990), entre otros. A raíz de todos estos hallazgos y de los principios establecidos por Stuart y col. en 1988, English enunció la llamada *hipótesis de la partición*, exponiendo que en los mamíferos la mayoría de los músculos esqueléticos y sus respectivos núcleos motores están subdivididos en elementos más

pequeños. Introdujo el término de *compartimento neuromuscular* para definir una porción del músculo que recibe inervación de un grupo específico de neuronas a través de una rama independiente, con propiedades biomecánicas propias y que puede ser reclutado de forma aislada en tareas específicas (English y col. 1993).

### 1.1.2 Anatomía comparativa del Tríceps braquial

Dentro del grupo de músculos multipeniformes se encuentra el *Tríceps braquial* (TB), un potente extensor del codo. Recibe inervación directa del *nervio radial* antes de dividirse en las ramas superficial y profunda (Miller 1997). Su nombre se debe a que está compuesto por tres fascículos o cabezas que se denominan: *largo*, *lateral* y *medial* (Fig. 1.3).



**Figura 1.3.** *Músculo tríceps braquial en la rata.* Vista lateral y medial de la extremidad anterior izquierda y derecha, respectivamente. Modificado a partir de: Popesko P. *Atlas of anatomy of small laboratory animals* Vol.II. Saunders Ltd. 2003.

En animales como el perro (Climent 1989; Dyce y col. 1996; Miller 1996) y el cerdo (Gruionu y col. 2000) aparece de forma fisiológica un cuarto *fascículo accesorio*, localizado entre el fascículo lateral y el medial. En humanos se han descrito anomalías unilaterales en la división del TB con aparición de un cuarto fascículo. En todos los casos descritos, los pacientes mostraron problemas asociados tales como debilidad o dolor debidos a compresión neuro-vascular (Tubbs y col. 2006; Fabrizio y Clemente

1997). Los tres (o cuatro) fascículos tienen un origen independiente y se insertan en la tuberosidad del olécranon formando un único tendón. El *fascículo largo* es biarticular y se origina en el tubérculo infraglenoideo de la escápula; el *lateral* y el *medial* son monoarticulares, el *lateral* se origina en el tubérculo mayor y el cuello del húmero, y el *medial* en el borde medial del cuello del húmero (Hebel y Stromberg 1974). En el caso del perro (Miller 1996) y el cerdo (Gruionu y col. 2000) el *fascículo accesorio* se origina en el cuello del húmero. El fascículo largo es significativamente más grande que los otros. De hecho, más del 80 % del peso total del músculo se debe al largo en comparación con el 15 % y 3 % que representan los fascículos lateral y medial, respectivamente, en el caballo (Watson 2007).

Los músculos con función extensora suelen presentar una región profunda rica en fibras oxidativas (tipo 1 según la técnica histoquímica ATPasa) y sobre ésta una región con fibras glucolíticas (tipos 2A y 2B) (Ijkema-Paassen y Gramsbergen 2005). En el TB, el mayor porcentaje de fibras tipo 1 se encuentra en el fascículo medial y en la región profunda del largo, mientras que el lateral y la región superficial del largo están formadas principalmente por fibras tipo 2 (Elder y col. 1982; Harridge y col. 1996; Fuentes y col. 1998; Fischer 1999; von Mering y Fischer 1999; Scholle y col. 2001; Matsumoto y col. 2007). La distribución segregada de los tipos de fibras que acabamos de describir en el TB no es universal. En el conejo, este músculo presenta una distribución uniforme de los distintos tipos de fibras musculares. Además, el fascículo largo tiene casi 4 veces más fibras de contracción lenta que en la rata (Fuentes y col. 1998). Los fascículos largo y lateral están constituidos por fibras musculares largas y grandes, mientras que las fibras del medial son cortas y pequeñas (Watson y Wilson 2007) con un tamaño medio muy similar entre las tipos 1 y 2 (Harridge y col. 1996; Friedhelm 1999). Detalles adicionales sobre la organización de las fibras musculares se han obtenido en *Galea musteloides*, en el cual el fascículo lateral tiene fibras más largas y orientadas más uniformemente que el largo, donde se aprecian dos porciones: anterior y posterior, con orientación diferente de sus fibras (Gorb y Fischer 2000). Por otra parte, existe una relación directa entre el peso del animal y la cantidad de fibras tipo 1 presentes en los músculos posturales de los miembros anteriores. A mayor peso mayor número de fibras deben ser activadas de forma mantenida para contrarrestar la fuerza de

la gravedad (Fuentes y col. 1998).

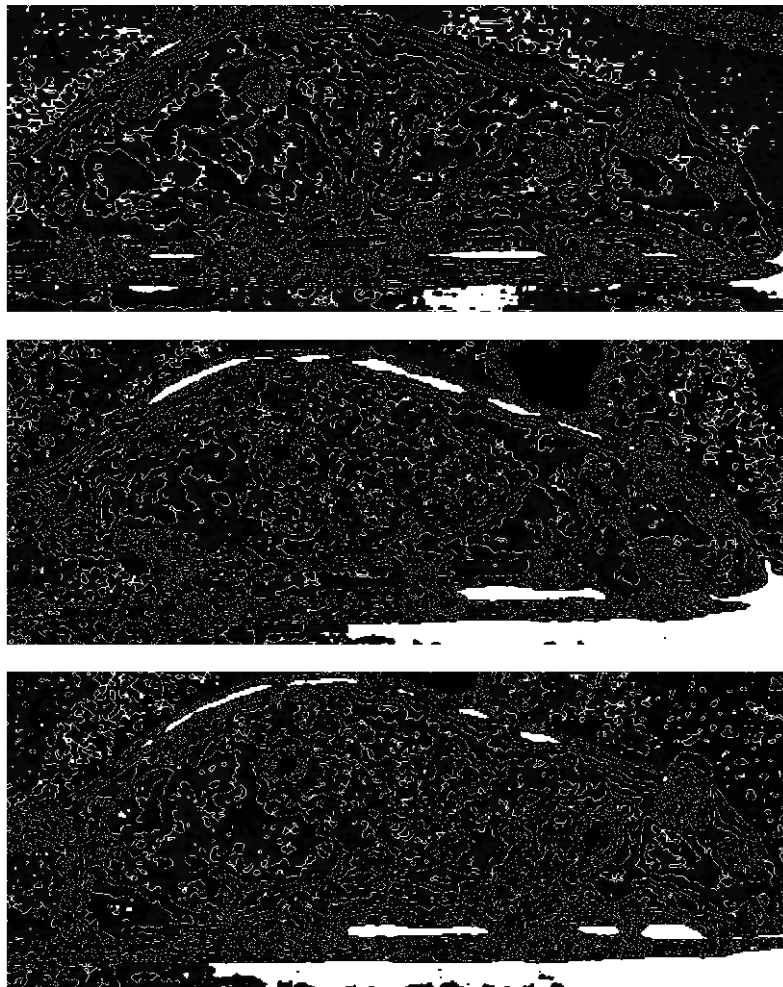
### **1.1.3 Aspectos funcionales del Tríceps braquial y su participación en los diferentes tipos de movimiento.**

El TB es el principal responsable de la *extensión del codo*, en la que también participa el ancóneo. La naturaleza biarticular del fascículo largo, que cruza las articulaciones del hombro y el codo, le concede también cierto papel en los movimientos de *extensión y aducción del hombro*. En los animales cuadrúpedos, el TB desempeña una función esencialmente anti-gravitatoria, tanto durante la locomoción como en el control postural (Scholle y col. 2001). El extensor equivalente del TB en el miembro posterior es el Tríceps sural, que está formado por el gastrocnemio (lateral y medial) y el sóleo.

Antes de definir la acción del TB durante la marcha conviene describir brevemente este proceso. El *ciclo de marcha* comienza cuando una extremidad contacta con el suelo y termina con el siguiente apoyo de la misma extremidad. Los dos principales componentes del ciclo son la *fase de apoyo* y la *fase aérea*, según el miembro esté en contacto o no con el suelo. Durante el apoyo la extremidad proporciona el soporte y la propulsión del cuerpo. Cada una de las fases se subdivide en dos partes en relación con la activación de grupos musculares específicos. En la *fase aérea* se distinguen dos procesos: la *fase F* en la que la extremidad se flexiona y se eleva del suelo, y la *fase EI* en la que se vuelve a extender previamente a su apoyo (Fig. 1.4). A continuación comienza la fase de apoyo, en la que se realiza el mayor trabajo que se requiere para la locomoción (Alexander 2002). En esta tiene lugar una activación progresiva de los músculos extensores (Endberg y Lundberg 1969; Yakovenko y col. 2002), que alcanza su máximo a medida que aumenta el apoyo en el suelo (*E2* o *fase de cesión* de la marcha). Finalmente, los extensores impulsan el cuerpo hasta que la extremidad se separa del suelo (*E3*) y comienza de nuevo la fase aérea (Lieber 1998).

De forma general, los músculos extensores se activan justo antes de que la extremidad contacte con el suelo y dejan de actuar antes del inicio de la fase aérea. Registros de electromiografía de los fascículos largo y lateral del TB durante la marcha de la rata indican que la compartimentación anatómica del músculo conlleva especialización funcional. La porción proximal del fascículo largo se activa brevemente

justo antes de que la pata anterior contacte el suelo. Este músculo contribuye a estabilizar y colocar la extremidad en posición para comenzar a soportar la carga del cuerpo evitando que colapse la articulación. El fascículo lateral presenta máxima actividad durante la fase de apoyo, ya que gracias a su alto contenido de fibras tipo 2 genera rápidamente la fuerza necesaria para el soporte anti-gravitatorio (Cohen y Gans 1975; Fischer 1999; Scholley col. 2001; Schumann y col. 2002). En la cabra se ha detectado que durante la fase de apoyo el fascículo lateral sigue un patrón bifásico de activación con fases de estiramiento y acortamiento, mientras que el fascículo largo sufre un continuo acortamiento de sus fibras (Carrol y Biewener 2009).



**Figura 1.4.** *Cinématica del miembro anterior durante la marcha en la rata normal. A)* Momento en que se inicia la flexión del codo para elevar la extremidad del suelo durante la fase aérea. **B)** Extensión del codo justo al inicio del contacto con el suelo. **C)** La extremidad en apoyo soporta el peso del animal junto con el otro miembro del par diagonal, mientras las otras extremidades se levantan y avanzan otro paso.

En el humano, el TB actúa igualmente sobre la cintura escapular y el codo. La acción de cualquiera de los tres fascículos genera la extensión del codo, mientras que la activación del fascículo largo produce además aducción y rotación interna del hombro. El TB actúa como antagonista del bíceps braquial, y su acción coordinada permite tareas tan diversas como la colocación precisa del brazo para la manipulación de objetos ó tareas de esfuerzo como el lanzamiento de peso (Hermann 1962). La evolución a una posición bípeda en el hombre ha modificado la funcionalidad inicial del TB, que a pesar de haber perdido parte de sus funciones de soporte corporal, aún mantiene una gran potencia útil para evitar la caída y proteger las partes más sensibles del tronco y la cabeza. Además, genera fuerza extensora en la marcha cuadrúpeda del lactante y también cuando se altera la funcionalidad de los miembros inferiores, como ocurre al caminar con ayuda de muletas o bastones.

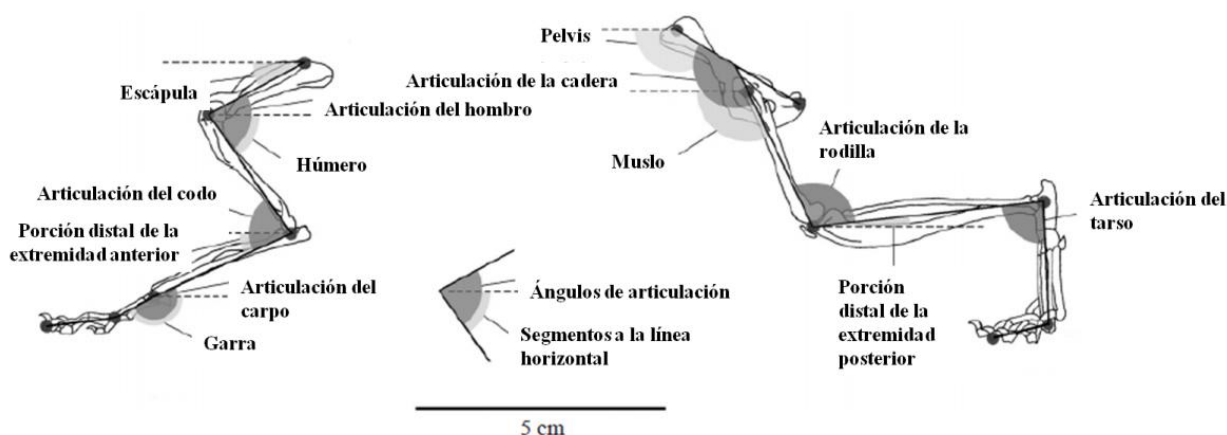
## **1.2 CONTROL NEURAL DE LA ACTIVACIÓN DEL TRICEPS BRAQUIAL**

### **1.2.1 Anatomía evolutiva de las extremidades y el sistema nervioso.**

En el desarrollo de las distintas especies existe una evolución paralela del sistema nervioso (SN) y las estructuras musculares. Las *anémonas* poseen un sistema neuromuscular muy primitivo formado por una red de pequeñas células nerviosas dispuestas de forma longitudinal a lo largo de todo el animal, que responden lentamente a los estímulos y le permiten al animal solamente realizar cambios posturales en el agua (Reisinger 1926). Los *peces* se desplazan mediante movimientos oscilantes por la contracción coordinada de su musculatura axial, generada por la actividad rítmica de neuronas inhibitorias y excitatorias. Estas neuronas se integran en la médula espinal formando un circuito (*generador central de pautas*) bajo control de sistemas descendentes mediales, principalmente el tracto reticuloespinal (Grillner y col. 1991). El siguiente grupo lo forman los *anfibios*, con capacidad para vivir fuera del agua y extremidades que elevan el cuerpo del suelo, aunque en su forma inmadura mantienen un desplazamiento basado en el movimiento ondulatorio del tronco. Los *reptiles* presentan extremidades más robustas (a excepción de las serpientes) que permiten un

desplazamiento terrestre más efectivo. En ambos grupos (anfibios y reptiles) aparecen vías axonales que descienden lateralmente en la médula, destacando el tracto rubroespinal, que hace numerosas sinapsis con las motoneuronas (MNs) de los músculos que inervan las extremidades, mientras que las MNs que inervan la musculatura del tronco siguen estando inervadas principalmente por los tractos mediales (reticuloespinal, vestibuloespinal y tectoespinal) (Vinay y col. 2000).

Finalmente, los *mamíferos* tienen extremidades largas y fuertes que les permiten desplazarse en tierra con mayor velocidad y agilidad. La musculatura del tronco y la cabeza estabiliza el cuerpo; y el desplazamiento latero-medial ondulatorio del tronco es reemplazado por el movimiento dorso-ventral de las extremidades que soportan y propulsan el cuerpo (Hildebrand 1974). Además, la subclase de los *terios* pasa de tener miembros con dos segmentos a tener tres (Fischer 1999). En el miembro anterior la escápula se vuelve móvil y aparece la articulación del tobillo en la extremidad posterior. La escápula y su musculatura se convierten en un elemento propulsor importante (Fischer 1999). Como consecuencia, se pierde la correlación funcional entre húmero y fémur. En la nueva estructuración anatómica tri-articular codo y tobillo son funcionalmente homólogos (Fischer y col. 2002). Así, el tríceps braquial y el tríceps sural trabajan como extensores del codo y del pie, respectivamente, desempeñando funciones análogas y manteniendo un ángulo articular similar (Fischer y Blickhan 2006), como se muestra en la Fig. 1.5.



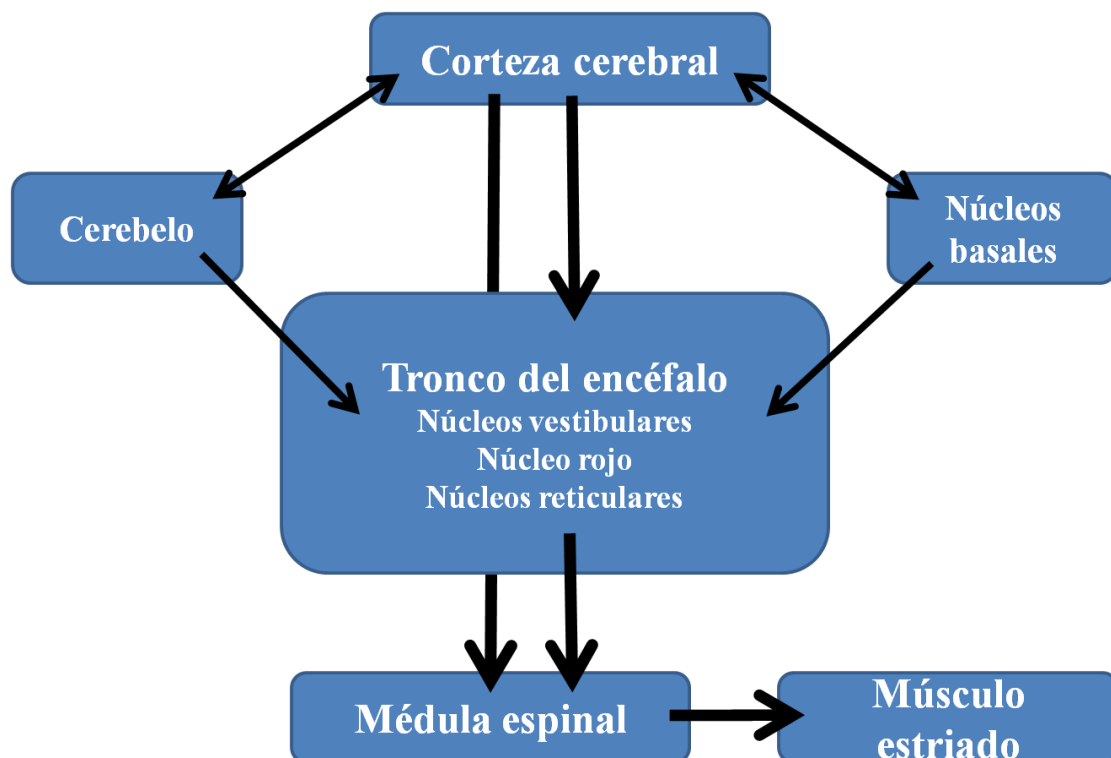
**Figura 1.5.** Miembro anterior y posterior de la rata. La imagen muestra puntos de referencia del esqueleto y los ángulos que miembros y articulaciones forman en el plano parasagital. Imagen modificada a partir de Fischer y col. 2002.

En los mamíferos se desarrollaron de forma muy notoria las estructuras telencefálicas, y se encuentran similitudes así como diferencias en el rol que juegan dichas estructuras en el control del movimiento en las diversas especies animales. Desde hace más de 3 millones de años los homínidos adoptaron una posición erecta, liberando al miembro anterior de la necesidad de soportar parte del peso durante la marcha. Este hecho permitió dirigir la funcionalidad del miembro a la realización de movimientos que requieren cierta destreza manual, junto con la especialización de sistemas neuronales para dirigir y controlar este tipo de tareas. Aparecieron uniones sinápticas directas del tracto corticoespinal con las MNs espinales (*proyección corticomotoneuronal*) que inervan los músculos de mano y brazo (Darian-Smith 2009), permitiendo realizar movimientos que requieren destreza manual y la ejecución de movimientos finos y separados de la mano y de los dedos. Este tipo de conexión directa sobre las MNs no existe en el gato, donde el control corticoespinal se realiza indirectamente mediante entradas de la corteza cerebral a los núcleos de la formación reticular que originan el sistema reticuloespinal; así como a través de interneuronas de la zona intermedia de la ME (Lemon y Griffiths 2005; Pierrot 2002), entre las que se incluye el sistema propioespinal C3-C4 (Lundberg 1999). El sistema cortico-reticuloespinal también se ha descrito en la rata (Alstermark y col. 2004), aunque el sistema propioespinal C3-C4 no se ha estudiado específicamente. La ausencia de conexiones corticomotoneuronales directas en el gato y la rata limita la ejecución de movimiento fraccionados de la garra, de manera que sólo pueden realizar tareas de prensión y sostén rudimentarias con las garras, a diferencia de los humanos y otros primates (Darian-Smith 2009; Nakajima y col. 2000). Además, el tracto rubroespinal en el *hombre* es casi inexistente a diferencia de lo que ocurre en el mono o en las ratas donde juega un importante papel en la realización de movimientos voluntarios.

En síntesis, podemos decir que la coordinación, velocidad y precisión con la que se llevan a cabo los movimientos en los mamíferos se produce gracias a la existencia de un control neural jerárquicamente organizado en tres niveles (Fig. 1.6): *médula espinal*, *tronco del encéfalo* y *corteza cerebral*. Cada uno de ellos tiene tanto la capacidad de procesar información sensorial como de organizar y emitir una respuesta motriz compleja bajo la influencia de los *ganglios basales* y el *cerebelo*. Estos núcleos



subcorticales constituyen circuitos de retroacción que regulan las áreas corticales y del tronco del encéfalo a partir de las aferencias que reciben. Proyectan a diferentes áreas corticales a través del tálamo y, aunque no mandan aferencias directas a la ME, actúan sobre las neuronas del tronco del encéfalo. El nivel inferior lo constituye la *medula espinal* que contiene circuitos neuronales capaces de desempeñar movimientos reflejos y rítmicos en los que participan neuronas sensitivas primarias, interneuronas y MNs que contactan directamente con el músculo generando patrones de activación y relajación muscular. En el siguiente nivel se encuentra el *tronco del encéfalo* formado por dos sistemas de neuronas (mediales y laterales) que descienden a la ME procedentes principalmente de los núcleos vestibulares, reticulares y rubroespinal y que regulan el mantenimiento de la postura y el equilibrio. El control jerárquicamente superior lo lleva a cabo la *corteza cerebral*, mediante señales procedentes de la *corteza motora primaria*, que interviene en la ejecución de movimientos precisos y en la coordinación visomotriz; y de *áreas premotoras*, que planifican la estrategia de movimiento.



**Figura 1.6.** Organización jerárquica del sistema neuromotriz. Se distinguen tres niveles principales de control organizados tanto en serie como en paralelo: médula espinal, tronco del encéfalo y corteza cerebral. Se han omitido los relevos sinápticos en el tálamo.

### 1.2.2 Médula espinal

La ME se divide en segmentos siguiendo la distribución de los pares de nervios espinales formados por axones sensoriales y motores con un patrón de organización estructural que se repite en toda su extensión. Cada segmento medular constituye en sí mismo una unidad de procesamiento de información que integra a tiempo real las señales procedentes del encéfalo, receptores sensoriales y otros segmentos medulares, permitiendo la ejecución de los movimientos de forma precisa y adecuada al contexto inmediato. Además, tiene circuitos intrínsecos como el *generador central de pautas* (GPG, de las iniciales en inglés) que activan coordinadamente la musculatura estriada para generar, independientemente del control supraespinal, el movimiento alternante y rítmico característico de la locomoción.

Los elementos neuronales propios de la ME son las *motoneuronas* (MNs), las *interneuronas* y las *neuronas de proyección* (espinotalámicas, espinocerebelosas, etc), éstas últimas conectan con regiones supraespinales constituyendo una vía de retroacción primaria (Wells 2003). A principios del siglo XX Sherrington estableció que las MNs constituyen la vía final común de salida del sistema nervioso al músculo. Existen varios tipos de MNs que se agrupan en la lámina 9 de la ME formando columnas que presentan ciertas características comunes y otras específicas del músculo que inervan (Kanning y col. 2010). Las MNs se pueden clasificar funcionalmente en tres grupos según el tipo de fibra muscular que inerven: alfa ( $\alpha$ -MNs), gamma ( $\gamma$ -MNs) y beta ( $\beta$ -MNs). Estas últimas constituyen un grupo menos definido que puede inervar tanto fibras extrafusales como intrafusales con características intermedias entre los otros dos tipos y de las que se distinguen dos subtipos: estáticas y dinámicas (Wells 2003). En la Tabla 1.3 se muestran las principales características diferenciales de las  $\alpha$ -MNs y  $\gamma$ -MNs (Westbury 1982; Wells 2003; Ishihara y col. 2006; Roy y col. 2007; Friesse y col. 2009; Kanning y col. 2010).

Características	Tipos de MNs	
	Alfa ( $\alpha$ -MNs)	Gamma ( $\gamma$ -MNs)
<b>Fibras que inerva</b>	Extrafusales	Intrafusales
<b>Función</b>	Generan fuerza para mantenimiento de la postura y movimiento	Detectan cambios en la longitud de la fibra muscular
<b>Área del soma</b>	$> 500 \mu\text{m}^2$	$< 500 \mu\text{m}^2$
<b>Longitud dendritas</b>	Similar	Similar
<b>Ramificación dendrítica</b>	Alta	Baja
<b>Entradas directas propioceptivas Ia</b>	Alta	No tiene
<b>Densidad sináptica en las dendritas proximales</b>	Alta	Baja
<b>Colaterales axonales</b>	Numerosos	Pocos
<b>Marcador molecular</b>	NeuN	Factor Err3
<b>Velocidad de conducción axonal</b>	Rápida (71 – 91 m / s)	Relativamente lenta (15 – 48 m / s)

**Tabla 1.3.** Características diferenciales de las MNs alfa y gamma.

Las propiedades metabólicas de las MNs y de las fibras musculares que inervan están directamente relacionadas (Mendell y col. 1994; Roy y col. 2000), mientras que el tamaño del soma y el nivel de actividad enzimática oxidativa de la célula cambian de forma inversamente proporcional (Ishihara y col. 2001). No existe una clara distinción entre los diferentes grupos de MNs, observándose un cambio progresivo en el tamaño, excitabilidad, patrón de disparo o velocidad de conducción (Kanning y col. 2010), aunque se pueden clasificar las  $\alpha$ -MNs en función del área de su soma. En la Tabla 1.4 se muestra este sistema de clasificación y las principales características de cada uno de los tipos.

Características	Tipos de $\alpha$ -MNs		
	Grandes	Intermedias	Pequeñas
Tamaño Soma	$> 900 \mu\text{m}^2$ *	$700 - 900 \mu\text{m}^2$	$500 - 700 \mu\text{m}^2$
Velocidad de conducción	$80 - 120 \text{ m / s}$	$80 - 100 \text{ m / s}$	$60 - 80 \text{ m / s}$
Fibras musculares que inervan	Rápidas (2B)	Rápidas (2A)	Lenta (1)
Unidad motora	Rápida fatigable (RF)	Rápida resistente fatiga (RRF)	Lenta (L)
Número de fibras que inerva	Alta	Medio alto	Bajo
Orden de reclutamiento	Tardío	Medio	Temprano
Patrón de descarga	Fásico	Tónico-Fásico	Tónico
Actividad enzimática oxidativa	Baja	Intermedia	Alta
Resistencia la fatiga	Baja	Intermedia	Alta

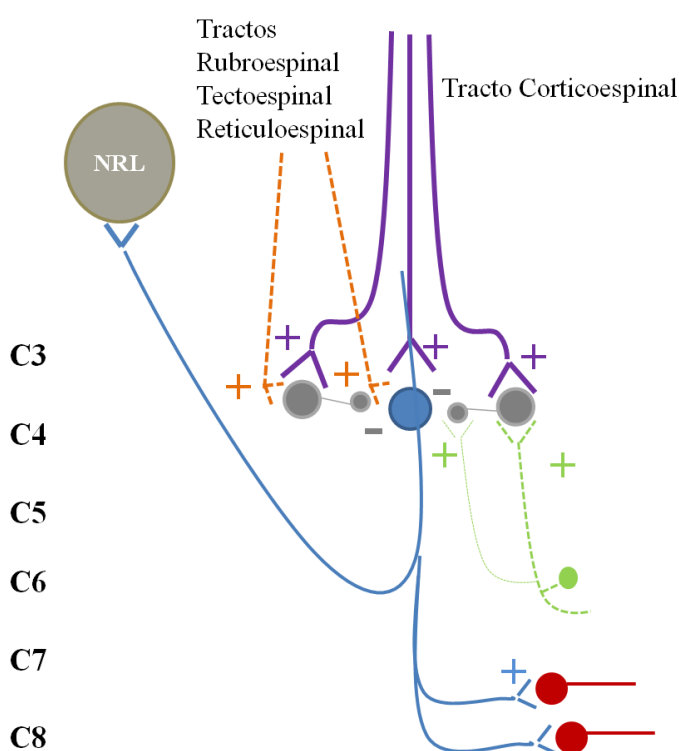
**Tabla 1.4.** *Propiedades de las  $\alpha$ -MNs.*

Las *interneuronas* (INs) constituyen otro componente esencial de la ME, permitiendo la integración y coordinación dentro de un segmento (neuronas intrasegmentarias) o entre segmentos distales (neuronas intersegmentarias o propioespinales). Las INs constituyen la principal fuente de entradas sinápticas a las MNs (Holstege 1991). Las INs que se localizan en la región lateral y medial del asta posterior reciben diferente conectividad (Petko y Antal 2000) y participan en el procesamiento sensitivo, transmisión a los centros supraespinales de forma directa o indirecta y en la actividad refleja mediante vías polisinápticas. Las INs localizadas en la región intermedia y anterior influyen en la actividad de las MNs. Funcionan como relevo de la entrada sensorial para ajustar la salida de las MNs, modulan y reciben señales procedentes de tractos descendentes que transmiten a MNs u otro tipo de neuronas, y forman parte de las redes neuronales que producen patrones de actividad rítmica. Integran y transmiten gran cantidad de información gracias a conexiones de tipo

divergente y convergente con otras neuronas, y a que existen mecanismos sinápticos que facilitan o silencian su actividad. Se clasifican en función de la longitud de su axón en *cortas*, *intermedias* y *largas* (Standring 2008). Las más *cortas* se localizan en la porción lateral de las láminas 5 a 8 y conectan regiones adyacentes a un segmento medular y sus axones discurren ipsilateralmente por el cordón lateral. Las de tipo *intermedio* ocupan la región central y medial de la lámina 7 y son principalmente de proyección ipsilateral. Los axones de las *largas* se distribuyen por toda la extensión de la ME, a través de los fascículos ventral y lateral, mientras que sus somas se localizan en la lámina 8 y en la porción dorsal de la lámina 7. Desde la región cervical los axones descienden bilateralmente, pero el ascenso desde la región lumbar se realiza principalmente de forma contralateral. Existe una gran relación entre la porción de sustancia blanca por la que discurren los axones de las neuronas propioespinales y las regiones de la sustancia gris a la que proyectan. Desde el cordón dorsolateral proyectan a la porción dorsal y lateral de la zona intermedia y a las MNs que inervan la musculatura de la extremidad distal. Las que discurren por la porción ventral del cordón ventrolateral se distribuyen por la región central y medial de la lámina 7 y MNs que inervan la musculatura de la extremidad proximal. Por último, las neuronas de la porción medial del cordón ventral proyectan a la porción ventromedial de la zona intermedia donde se concentran la mayoría de la neuronas propioespinales largas y las MNs que inervan la musculatura del tronco.

Además, se han estudiado en detalle varios tipos de INs que están implicadas en el control motor, entre las que destacan: 1) Las *Células de Renshaw*, localizadas en la porción ventral de la lámina 7 y que reciben colaterales de MNs a las que inactivan por *inhibición recurrente*. Regulan la fuerza producida por los músculos sinergistas, y favorecen la actividad de MNs fásicas sobre las MNs tónicas durante el movimiento. 2) Las *INs inhibitorias tipo Ia* se localizan en la porción dorsal de la lámina 7 y reciben aferencias de fibras Ia, cutáneas y de vías corticoespinales. Inhiben a los músculos antagonistas reduciendo la rigidez de la articulación y facilitando el movimiento. 3) Las *INs Ib*, reciben aferencias de fibras Ib procedentes de los órganos tendinosos de Golgi y de vías corticoespinales. Inhiben a los músculos sinergistas produciendo un mecanismo de retroacción negativo que regula la tensión muscular.

Las neuronas propioespinales se organizan formando redes en las que convergen señales descendentes, entradas sensoriales (de músculos, articulaciones y piel) (Baldissera y col. 1981) y sinapsis inhibitorias de otras INs permitiendo modificar y actualizar la señal supraespinal antes de llegar a la MN. Existe una red propioespinal conocida como *sistema premotoneuronal* que se localiza principalmente en la región cervical C3-C4 y ha sido descrito electrofisiológicamente en el gato (Alstermark y Lundberg 1992; Lundberg 1999), en primates y humanos (Pauvert y col. 1998). En la Fig. 1.7 se muestran las conexiones excitatorias e inhibitorias que recibe el sistema propioespinal antes de contactar con las MNs de la musculatura del miembro anterior, incluidas las MNs que inervan el TB. Las neuronas del sistema premotoneuronal cervical no solo se conectan con las MNs de los músculos del miembro anterior (Alstermark y Lundberg 1992) sino que además envían colaterales que ascienden hasta el *Núcleo reticular lateral* (NRL), y desde aquí se transmite al cerebelo una copia de las señales que reciben las MNs (Altermark 1981).



**Figura 1.7.** *Sistema propioespinal premotoneuronal cervical C3-C4 en gato.*

(Lundberg 1999). A la izquierda se indican los segmentos medulares. Las sinapsis excitatorias tienen un signo positivo y las inhibitorias uno negativo. Las neuronas se muestran con distintos colores: propioespinales, azul; tracto corticoespinal, morado; tractos rubroespinal, reticuloespinal y tectoespinal, naranja; INs inhibitorias, gris; aferentes sensoriales, verde; MNs, rojo.

### 1.2.3 Núcleo motor espinal y unidad motora.

El conjunto de MNs que inerva un músculo se dispone formando un entramado a modo de columna que recorre la ME a lo largo de dos o más segmentos y que recibe el nombre de *núcleo motor*. En cada segmento las MNs presentan ciertas características diferenciales como la distribución del árbol dendrítico (Vanner y Rose 1984) y los aferentes sensoriales que reciben de los músculos inervados, así como de otros músculos sinérgicos y antagonicos. El núcleo motor del TB ha sido estudiado mediante técnicas de trazado retrógrado de las MNs del fascículo largo (McKenna y col. 2000) y de todo el músculo (Gramsbergen y col. 1996; Saito 1986; Collazos-Castro y col. 2005), aunque se desconocen las características de los subgrupos de MNs que inervan cada uno de los fascículos. En la rata, la columna de MNs del TB se extiende hasta el inicio de T1; pero hay disparidad de opinión en su origen, que se localiza entre el final del segmento C6 (Gramsbergen y col. 1996; Collazos-Castro y col. 2005) y la región proximal de C7 (Saito 1986). Cuando se han trazado solamente las MNs del fascículo largo, se han localizado desde la mitad de C6 hasta la porción caudal de C8, buena parte de ellas concentrada entre la porción rostral de C7 y la mitad de C8 (McKenna y col. 2000). Por otra parte, el núcleo motor del TB está distanciado caudalmente varios segmentos del que inerva a su antagonista (bíceps braquial), localizándose junto a los núcleos motores de músculos de la muñeca y de los dedos (McKenna y col. 2000). Los núcleos motores que inervan el TB en la iguana y los fascículos largo y lateral en el ratón tienen un tamaño similar (próximo a 100 neuronas), pero se extienden por más de 3 mm entre C7 y C8 en la iguana mientras que en el ratón las columnas de ambos fascículos apenas llegan a 2 mm y se encuentran entre C6 y C7 (Ryan y col. 1998).

Cada una de las MNs del núcleo motor inerva un número determinado de fibras espaciadas en el interior del músculo gracias a la amplia ramificación de su axón, lo que asegura la propagación uniforme de la fuerza contráctil y reduce el impacto del daño de una o más MNs sobre la acción muscular. En el animal adulto cada fibra muscular recibe inervación de una única neurona (Ijkema-Paassen y Gramsbergen 1998) a través de una sinapsis química que se denomina *placa motora o unión neuromuscular*. El conjunto de fibras musculares que inerva una misma MN se denomina *unidad muscular*, que junto con la neurona forman la unidad de fuerza más pequeña que puede

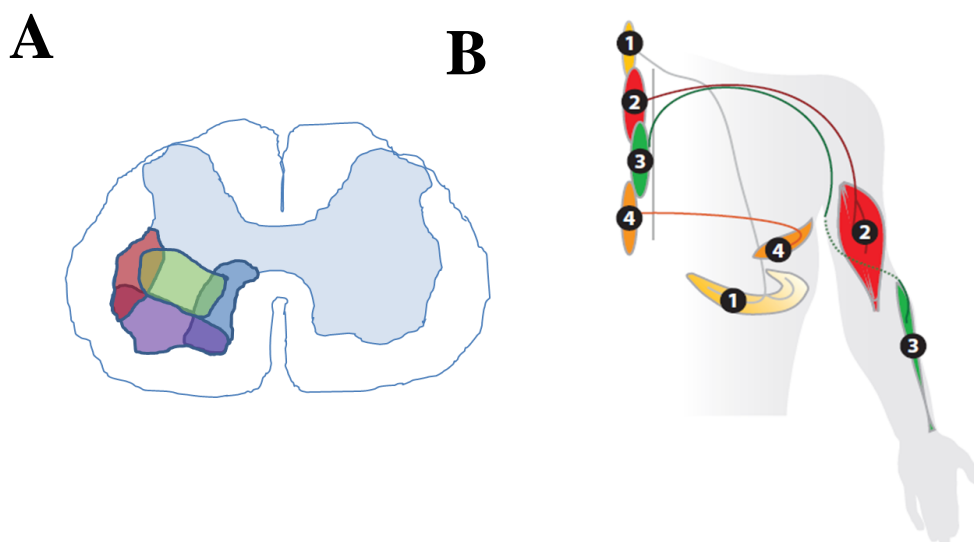
activarse para producir movimiento y que Sherrington (1925) denominó *unidad motora* (UM). Las UMs se clasifican en función del tipo de fibra y MN que la inerva en tres tipos: Lentas (L), rápidas resistentes a la fatiga (RRF) y rápidas fatigables (RF) cuyas características (Tabla 1.4). La *tasa de inervación* es el número de fibras que inerva cada MN, depende del tipo de UM y constituye el factor clave que determina la fuerza que es capaz de ejercer (Enoka y Fuglevand 2001). En el miembro posterior del gato, las UMs tipo L tienen un tamaño medio de 100 fibras / MN mientras que el valor medio en las RF es de 300 (Kadhiresan y col. 1996). Aunque el punto clave que determina la funcionalidad de un músculo no es el tamaño medio de cada tipo de UM, sino el valor medio de la suma de todos los tipos de UM que lo constituyen (Enoka y Fuglevand 2001). Un ejemplo de esta especialización estructural se observa al comparar el músculo soleo (180 fibras / MN de promedio), un músculo importante para el control postural, y el gastrocnemio (1500 fibras / MN de promedio) que participa en cambios súbitos del cuerpo que requieren mucha fuerza (Enoka y Fuglevand 2001). En músculos con funciones altamente especializadas como los extraoculares o laríngeos (Standring 2008), la precisión de los movimientos se consigue gracias una tasa de inervación muy pequeña (4 - 10 fibras / MN). En humanos mayores de 60 años disminuye el número de unidades motoras y aumenta la tasa media de inervación (McComas 1995). La composición de fibras de un músculo no es fija y puede ser modificada de forma fisiológica a través del entrenamiento dirigido a la realización de movimientos rápidos y breves (fuerza) o lentos pero prolongados (resistencia). De igual manera, después de una lesión o en condiciones de microgravedad las fibras de contracción lenta pasan a contraerse más rápidamente y disminuyen su resistencia a la fatiga (Lieber 1998; Ishihara y col. 2003). Las variaciones de fuerza ejercida que se observan son consecuencia tanto de cambios en el componente muscular como nervioso (Moritani y DeVries 1979) aunque las MNs son más resistentes a los cambios de tamaño o de propiedades metabólicas que las fibras musculares que inervan (Ishihara y col. 2003).

#### **1.2.4 Topografía y reclutamiento de las MNs y sus implicaciones funcionales.**

Estudios en reptiles, aves y mamíferos (Ryan y col. 1998) han demostrado que existe



una relación de ordenación entre la localización de los grupos de MNs y los músculos que éstas inervan tanto en sentido longitudinal como en la dimensión medio-lateral y dorso-ventral de la ME, proporcionando un mapa espacial de la musculatura del cuerpo (Fig. 1.8). En el caso de las extremidades, se conocen los detalles tanto del miembro anterior (McKenna y col. 2000) como del posterior (Nicolopoulos-Stournaras e Iles 1983). Las MNs que inervan la musculatura axial se localizan hacia la línea media y las MNs que inervan las extremidades se localizan lateralmente. Las MNs para los músculos de las extremidades están organizadas en el eje longitudinal de la médula, como norma general estando más craneales las MNs para los hombros (o pelvis) y más caudales las de la parte distal de la extremidad. Además, las MNs para los grupos musculares flexores se encuentran más dorsales y las MNs de los músculos extensores, más ventrales. Como consecuencia, las proyecciones del tracto corticoespinal que regulan los movimientos precisos de la mano y de los dedos en el humano terminan en las MNs dorsales y laterales, mientras que los axones de los tractos reticuloespinal y vestibuloespinal, que regulan el tono básico del tronco y la postura, terminan en MNs ventrales y mediales (Lemon 2009). Además, las interneuronas mediales de las láminas 7 y 8 inervan MNs mediales y las laterales inervan MNs laterales (Kandel 2001).



**Figura 1.8.** Organización topográfica de la ME. **A)** Corte transversal de la ME en donde se representan las zonas que contienen MNs para los músculos distales en rojo, extensores en morado, flexores en verde y los músculos proximales y axiales en azul. **B)** Esquema de la localización cráneo-caudal de las MNs que inervan: **1)** El diafragma, **2)** bíceps braquial, **3)** músculo supinador largo, y **4)** músculos intercostales.

La fuerza ejercida por un músculo se incrementa en paralelo con el número de UM activas (*reclutamiento espacial*) o con su frecuencia de disparo (*reclutamiento temporal*) (Binder y Mendell 1990). Generalmente, los músculos están compuestos por distintos tipos de UMs que, en función del movimiento e intensidad requerida, se reclutan progresivamente desde las más pequeñas y débiles hasta las más grandes y fuertes siguiendo el “*principio de tamaño de Henneman*” (Henneman 1985; Henneman 1974; Henneman 1957; Henneman, Somjen y Carpenter 1965) y se desactivan en orden inverso a su activación (Binder y Mendell 1990). Además, la cantidad de entradas excitatorias necesarias para activar una MN, el número de fibras que la MN inerva, las propiedades contráctiles de la UM, la frecuencia de disparo e incluso la tasa de síntesis proteica están directamente correlacionadas con el tamaño de la MN (Henneman 1977).

En músculos como el sóleo los sistemas descendentes, aferentes sensoriales y circuitos locales distribuyen homogéneamente sus entradas a todas las MNs (Mendel y Henneman 1971), regulando con un patrón simple la intensidad, inicio y terminación de la activación muscular. Estudios anatómicos y registros intracelulares han demostrado que los aferentes sensoriales en gato (Mendel y Henneman 1971; Brown y Fyffe 1978) y los axones del tracto corticoespinal en primates no humanos (McKiernan y col. 1998) conectan sobre la mayoría de las MNs de un mismo núcleo motor e incluso con los núcleos de músculos sinérgicos adyacentes, aunque no en la misma proporción. La cantidad de conexiones que recibe cada MN está relacionada con el tamaño del soma, de forma que la densidad final de conectividad es similar para todas las células (Mendell y Henneman 1971). Estos hallazgos han llevado a definir el núcleo motor como una entidad anatómica y funcional que recibe entradas sinápticas similares y, por tanto, todas las MNs que lo componen están bajo un mismo control. Sin embargo, los músculos no siempre funcionan como una entidad con un único patrón de reclutamiento (Gordon y col. 1991), existiendo músculos que presentan más de un patrón de activación a pesar de recibir inervación de un único núcleo motor que forma una columna de MNs sin aparente distinción entre ellas. Este es el caso del músculo sartorio en el gato (Hoffer y col. 1987), cuya función principal es la flexión de la cadera que está inervado por un único núcleo motor pero funcionalmente presenta dos regiones claramente diferenciadas que participan en otros movimientos. La parte más medial del

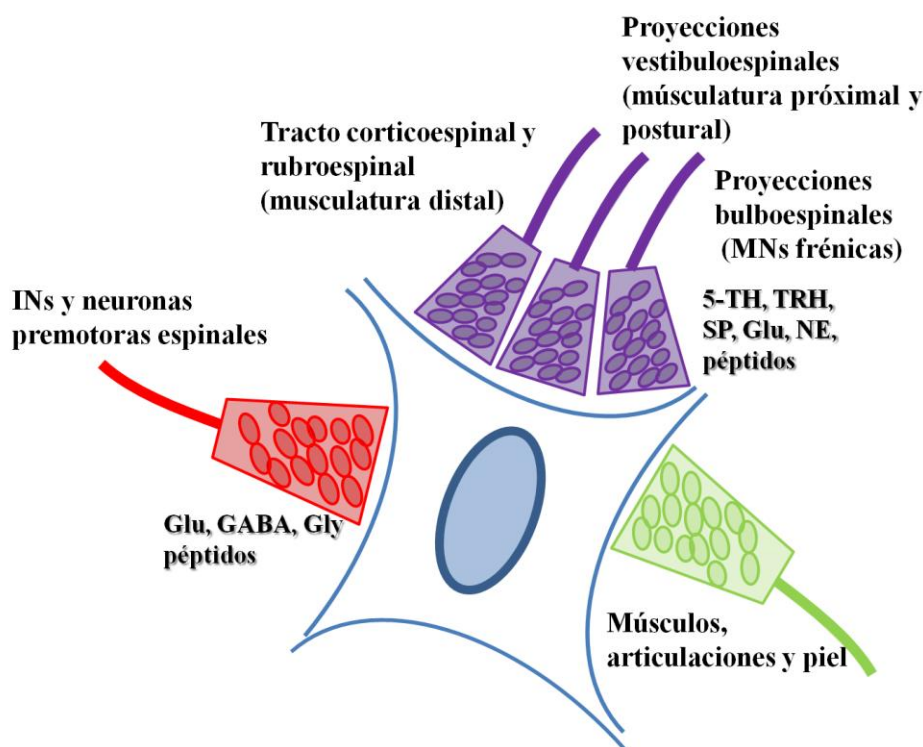
músculo se inserta en la tibia e interviene en la flexión de la rodilla y la parte más anterior se inserta en la rótula y actúa en su extensión, a través de dos grupos de MNs que se reclutan de forma independiente (Sherrington 1910). Estas dos funciones se corresponden con patrones cinemáticos durante la marcha; acortamiento activo durante la fase aérea y estiramiento activo durante el apoyo. Aunque durante los reflejos de flexión por la activación del nervio cutáneo se reclutan juntos (Loeb y col. 1987). Además, como se ha mencionado anteriormente, la teoría desarrollada por English (English y col. 1993) establece la existencia de músculos divididos en compartimentos inervados por sub-grupos de MNs independientes que siguen un orden de reclutamiento propio y que pueden actuar de forma conjunta o independiente. Este es el caso del diafragma, capaz de activarse con un patrón único durante el movimiento sincrónico de la ventilación, o de activarse selectivamente en determinadas regiones siguiendo diferentes patrones de activación para tareas como vomitar, eructar o tragar. Cada una de las regiones que lo componen está inervada por distintos sub-núcleos motores entremezclados en una única columna, que reciben inervación común y específica de las señales descendentes (Gordon y Richmond 1990).

Una cuestión importante es cómo se lleva a cabo esta selección en la conectividad de los diferentes subnúcleos dentro del entramado de neuronas que conforman la columna. La posición del soma en el eje rostro-caudal puede estar relacionada con la localización de la unidad muscular en los ejes dorso-ventral o medio-lateral del músculo. Esto ocurre tanto en músculos mecánicamente heterogéneos a lo largo de sus ejes, como el músculo sartorio (Prat y col. 1984), o en aquellos más homogéneos como los compartimentos del gastrocnemio lateral (Kernell 1986). La *teoría de la “especificidad de localización”* establece que las entradas propioceptivas están compartimentalizadas en base a la proximidad física del punto de entrada de la raíz dorsal a la columna ventral de MNs (Scott y Mendell 1976). Además, factores bioquímicos o de la actividad fisiológica de las neuronas podrían ser determinantes para el reclutamiento selectivo de grupos de MNs del mismo núcleo motor (Gordon y Richmond 1990). Por otro lado, el tensor de la fascia lata (Pare y col. 1981; Chanaud y col. 1986) y el semitendinoso (Bondine y col. 1982) son dos ejemplos de músculos que tienen regiones arquitectónicamente y funcionalmente diferenciadas.

### 1.2.5 Aspectos cuantitativos de las entradas sinápticas a un segmento medular.

Se ha estimado que como media las MNs de los gatos adultos contienen entre 50000 y 140000 botones sinápticos, de los cuales más del 93 % se localizan sobre el árbol dendrítico (Örnung y col. 1998). Además, en las dendritas primarias hay casi 4 veces más botones sinápticos positivos para GABA y glicina que para glutamato, mientras que en regiones más distales esta proporción se reduce a 1.5, y sólo un 6 % pertenece a otro tipo de neurotransmisor (Örnung y col. 1998). Una estimación cuantitativa sobre el tipo de terminales que cubre el soma de las  $\alpha$ -MNs ha establecido que entre el 26 – 42 % de los terminales somáticos son inmunoreactivos para glicina, entre el 10 – 24 % lo son para GABA y sólo entre 5 – 9 % para glutamato (Shupliakov y col. 1993). Aunque la mayoría de las conexiones que reciben las MNs se realizan indirectamente a través de neuronas *propioespinales* o *INs* (Holstege 1991), también reciben conexiones directas como *aferentes monosinápticas de los husos musculares* tipo I, que liberan glutamato (Örnung y col. 1995), y tipo II. Además, las MNs reciben contactos de *axones recurrentes* de colaterales de otras MNs que inervan el mismo u otro músculo sinergista (Cullheim y Kellerth 1978). Las *células de Renshaw*, a través de proyecciones que liberan GABA o glicina, producen inhibición recurrente de MNs que inervan músculos proximales (Fyffe 1991). De igual forma contactan axones de *neuronas* localizadas en diversas regiones y núcleos del *tronco del encéfalo*, entre las que podemos destacar: los *núcleos pálido y oscuro del rafe* a través de los cordones lateral y ventral (Basbaum y col. 1978); neuronas noradrenérgicas procedentes del *Locus cerúleo*, *subcerúleo*, *núcleos lateral y medial parabraquial*, y *núcleo de Kölliker-Fuse* (Clark y Proudfit 1991); *núcleo retroambiguo* (Holstege 1989) y *núcleo del tracto solitario* (Ellenberger y col. 1990). El *sistema vestibuloespinal* (núcleos medial y lateral) proyecta a MNs del cuello, cabeza y lumbosacras (Donevan y col. 1990). El *núcleo rojo* conecta con MNs que inervan músculos distales (Fujito y Aoki 1995). Las *sinapsis corticomotoneuronales directas* sólo se han demostrado con certeza en humanos (Schieber 2007) y otros primates (Bortoff y Strick 1993), generalmente sobre MNs que inervan la musculatura distal de las extremidades. Sin embargo, la mayoría de los axones corticoespinales influyen indirectamente sobre las MNs por medio de INs

localizadas en la región intermedia de la ME (Fig. 1.9).



**Figura 1.9.** Principales entradas sinápticas a las MNs. Se representa la variedad de sistemas que proyectan sobre las MNs espinales y los neurotransmisores mas frecuentes: Glutamato (**Glu**), GABA, Glicina (**Gly**), serotonina (**5-HT**), Norepinefrina (**NE**) y neuropéptidos. Los sistemas supraespinales son más numerosos, aunque resultan menos números en cuanto a la cantidad de sinapsis sobre las MNs en comparación con las recibidas de INs y neuronas premotoras espinales. La vía corticomotoneuronal está mucho más desarrollada en humanos y otros primates. Las aferentes sensoriales de los músculos, articulaciones y piel también proyectan sobre los sistemas premotores y de INs (Rekling y col. 2000).

### 1.3 CONSECUENCIAS DE UNA LESIÓN MEDULAR SOBRE LOS CIRCUITOS NEURALES ESPINALES.

La organización segmentaria de la ME (apartado 1.2.2) hace que cada uno de los síndromes, síntomas o signos observados después de una lesión sean consecuencia directa del nivel en el que ocurre y de su extensión. De forma general, la pérdida de movimiento voluntario y sensibilidad por debajo de la lesión se relaciona con la

extensión transversal del daño que interrumpe los tractos axonales ascendentes y descendentes. Además, la muerte neuronal local destruye los circuitos espinales y contribuye a las alteraciones neuromotrices (Thomas y col. 1997; Collazos-Castro y col. 2005). En otras palabras, las pérdidas funcionales permanentes tras la lesión medular se deben a la axotomía y subsiguiente desinervación neuronal, así como a la muerte neuronal segmentaria. Un tipo especial de lesión medular es la hemisección o *síndrome de Brown-Séquard* (Brown-Séquard 1868) que, como su nombre indica, afecta a una hemimédula completa produciendo alteraciones sensitivo-motoras bilaterales asimétricas. En este caso la lesión del *fascículo corticoespinal lateral* produce hemiparesia ipsilateral a la lesión, el daño de los *tractos sensoriales anterolaterales* causa pérdida de la sensibilidad dolorosa (hipoalgesia) y térmica del lado contralateral, y la lesión de las *columnas posteriores* (tractos grácil y cuneiforme) altera la sensibilidad vibratoria, propiocepción y el tacto discriminatorio del lado ipsilateral (Kirshblum y O'Connor, 1998). En los individuos con este tipo de lesión se ha observado cierta *recuperación funcional espontánea* (Little y col. 1999) que ha sido atribuida a diversos procesos de “plasticidad” en los circuitos espinales que brevemente se describen a continuación.

En la zona de la lesión se produce activación de la microglia y de astrocitos que se tornan “reactivos” o “fibrosos” cambiando su número y morfología e incrementando la expresión de proteína fibrilar ácida de la glía (GFAP) y de proteoglicanos que inhiben la regeneración axonal (Nieto-Sampedro 1999; Nieto-Sampedro y col. 2002). A pesar del fallo regenerativo, en el SNC tienen lugar numerosos cambios fisiológicos y anatómicos que influyen en la función neurológica. Inmediatamente después de lesionarse la ME el individuo desarrolla un estado transitorio que se ha denominado *shock medular*, que se caracteriza por una pérdida temporal de la excitabilidad neuronal en zonas distantes a la lesión, con eliminación o disminución de los reflejos medulares y parálisis flácida. Este síndrome transitorio aparece como consecuencia de la *hiperpolarización* de las MNs por pérdida de excitación tónica supraespinal junto a un aumento en la concentración local de glicina e inhibición presináptica (Hiersemenzel y col. 2000; Nacimiento y Noth 1999; Barnes y Schadt 1979). La ausencia de liberación de serotonina y norepinefrina por parte de axones bulboespinales también juega un

papel importante (Little y col. 1999). Una vez superada la fase de shock algunos grupos de MNs e INs muestran una mayor respuesta inicial a los neurotransmisores, llamada *hipersensibilidad post-desinervación*, que se debe a cambios en los receptores postsinápticos (Bach-y-Rita e Illis 1993) que implican defosforilación, y que además cursa con aumento del número de receptores excitatorios y disminución de los inhibitorios (Little y col. 1999). El estado de hiperexcitabilidad puede contribuir a la recuperación funcional o a fenómenos patológicos como la espasticidad. Otro mecanismo implicado es el *desenmascaramiento de sinapsis* (Wall 1997; Bach y Rita 1980; Nelson y Mendell 1979), proceso por el que se activan sinapsis preexistentes pero que estaban silentes. Conjuntamente con el nuevo estado funcional se observan cambios morfológicos permanentes a nivel presináptico en las aferentes ya existentes (Steward 1989), con aumento del número de sinapsis o de su tamaño como sucede en los terminales glutamatérgicos y GABAérgicos sobre MNs desinervadas (Tai y col. 1997). El fenómeno en el que los axones no lesionados multiplican sus terminales sobre las dianas parcialmente desinervadas se denomina *sinaptogénesis reactiva* y se describe más ampliamente en el *apartado 3.3*. Resulta conveniente analizar más en profundidad algunos de los cambios en los circuitos neurales que ocurren tras la lesión medular.

### **1.3.1 Cambios en la neurona axotomizada**

La axotomía produce la división del axón en dos porciones o extremos (proximal y distal) que sufren una serie de procesos diferentes e independientes. Además, en el soma se presentan cambios morfológicos con cromatolisis en la fase aguda de la lesión, caracterizados por la dispersión de los cuerpos de Nissl, desplazamiento del núcleo a una posición excéntrica y aumento del volumen citoplasmático. Algunos de estos procesos son manifestaciones del aumento de la actividad metabólica (síntesis proteica) que experimenta inicialmente la célula, pero generalmente acaba produciéndose algo de atrofia del soma y del árbol dendrítico. En algunos tipos específicos de neuronas (neuronas internucleares del abducens), la axotomía causa retracción de los terminales sinápticos que reciben con aumento de su cobertura por prolongaciones de astrocitos y depresión persistente de su actividad electrofisiológica (De La Cruz y col. 2000),

mientras que en otros (neuronas rubroespinales y corticoespinales) no ocurre retracción sináptica y los cambios electrofisiológicos son más diversos con aumento final de su excitabilidad (Tseng y Prince 1996; Chen y Tseng 1997; Wang y Tseng 2004). La respuesta parece estar determinada por el número de colaterales axonales que queda indemne y que forma sinapsis con otras neuronas.

La lesión medular axotomiza neuronas de diferentes sistemas descendentes y ascendentes, así como múltiples neuronas propioespinales. Los cambios de las entradas sinápticas a la mayoría de estos sistemas no han sido estudiados desde un punto de vista estructural. No obstante, se ha observado que las neuronas supraespinales corticales (Tseng y Prince 1996) y del núcleo rojo (Chen y Tseng 1997) que sobreviven a la axotomía son funcionalmente activas aunque presentan alteraciones en las propiedades intrínsecas y en la conectividad sináptica. El soma experimenta una marcada atrofia observable antes del mes y que después se mantiene con una progresión muy lenta (Tseng y Prince 1996). Algunas neuronas propioespinales parecen responder más dramáticamente. Por ejemplo, más de la mitad de las neuronas de la médula torácica que proyectan a la región lumbar mueren después de la axotomía (Siebert y col. 2010).

Un modelo de axotomía bastante bien estudiado tanto neurofisiológica como anatómicamente es el de las neuronas internucleares del abducens. Como consecuencia de una axotomía en los individuos adultos se produce un descenso progresivo en la densidad de las aferentes sinápticas (Pastor y co. 2000; De La Cruz y col. 2000) que se acompaña de una importante reacción glial alrededor de los somas. En el desarrollo de estos fenómenos interviene la falta de aporte trófico que se produce como consecuencia de la axotomía y puede revertir si la neurona recupera el contacto con la célula diana original o con otra neurona (Benítez-Temiño y col. 2005). Las MNs de los músculos extraoculares axotomizadas también pierden las entradas sinápticas, y se ha demostrado recientemente que el proceso puede revertirse mediante el suministro de factores tróficos como el NT-3 y el BDNF (Davis-López de Carrizosa y col. 2009) ó el NGF (Davis-López de Carrizosa y col. 2010).

También se han realizado varios estudios sobre los cambios que tienen lugar en las entradas sinápticas a las MNs espinales axotomizadas, en las cuales se modifican las



propiedades de la membrana produciendo un descenso inicial de su excitabilidad para finalmente ser más sensibles a aferentes excitatorios (Eccles y col. 1958). En individuos neonatales la supervivencia neuronal y de sus contactos sinápticos es muy dependiente de la presencia de factores neurotróficos (Wells y col. 1999), ocurriendo apoptosis en un número elevado (80 %) de las neuronas axotomizadas, a diferencia de lo que se observa (20 %) en organismos adultos (Kashihara y col. 1987). Estudios en animales neonatales han detectado una disminución exponencialmente progresiva en el número de sinapsis después de la axotomía (Snedecor y Cochran 1980), ocurriendo la mayor pérdida de MNs en las primeras 24 a 48 horas y la mayor tasa de degeneración sináptica entre las 12 a 24 horas. (Tiraihi y Rezaie 2004). Además, tras la sección de un nervio los procesos de cromatolisis se extienden al 74 – 75 % de las neuronas que presentan cambios sinápticos asociados (Matthews y Nelson 1975). Hay mucha menos muerte en las MNs adultas axotomizadas, pero estas pierden inicialmente mas de la mitad de las sinapsis aferentes (Bondok y Sansone 1984). Las moléculas MHC-I intervienen en la retracción de las sinapsis durante el desarrollo (Huh y col. 2000) y en el mantenimiento selectivo de sinapsis sobre las MNs axotomizadas (Oliveira y col. 2004).

Por otra parte, el extremo proximal del axón seccionado puede generar nuevas ramas colaterales que se distinguen de una respuesta regenerativa al no suponer la elongación normal desde el extremo lesionado. Además, se ha visto que la porción proximal inmediata al soma emite colaterales tras la axotomía (Fouad y col. 2001), que podrían estar implicados en la formación de nuevas conexiones entre las neuronas supraespinales lesionadas y las neuronas propioespinales, creando circuitos alternativos para la transmisión de señales corticoespinales a segmentos caudales a la lesión (Bareyre y col. 2004). Finalmente, el *extremo distal* del axón cortado degenera progresivamente mediante una serie de procesos celulares muy estereotipados que se han denominado *degeneración Walleriana* (Waller 1850), durante la cual se produce la ruptura y degradación de los axones lesionados y vainas de mielina que los recubren (George y Griffin 1994). Los fragmentos restantes de estas estructuras son fagocitados por la microglia durante un periodo que dura meses (Schmitt y col 1998).

### 1.3.2 Desinervación y muerte transneuronal

La interrupción de los tractos axonales como consecuencia de una lesión medular provoca que ciertos grupos de neuronas pierdan en mayor o menor grado las entradas sinápticas, lo cual induce un amplio espectro de cambios estructurales y funcionales en la neurona postsináptica. Las terminales sinápticas sobre el soma y las dendritas proximales empiezan a degenerar a las 4 horas postlesión (Li y col. 2004), aunque la fagocitosis de las terminales se lleva a cabo por microglia y astrocitos reactivos a partir de los 3 días siguientes (Nacimiento y col. 1995). Se ha detectado una reducción del 12 al 25 % en el número de terminales sinápticos en la médula lumbar 3 semanas después de una hemisección medular en la región torácica (Nacimiento y col. 1995). Tanto en las MNs lumbares después de una lesión torácica por hemisección (Nacimiento y col. 1995) como durante el proceso de regeneración de MNs axotomizadas (Kreutzberg 1993) se ha observado una eliminación selectiva de los terminales axosómicos acompañado de una reacción astrogliar perineuronal. Este tipo de terminales forman principalmente contactos inhibitorios sobre las MNs (Shupliakov y col. 1993), produciendo un incremento en la excitabilidad de las MNs caudales a la lesión que se mantiene en crónicamente (Thompson y col. 1992). Además, la desinervación puede producir disminución del tamaño de la célula postsináptica y pérdida de parte de las espinas dendríticas (Caceres y Steward 1983) o de la mayoría del árbol dendrítico (Deitch y Rubel 1989). Estos fenómenos se incluyen dentro de un proceso denominado *atrofia transneuronal* que puede ser revertido si la célula es reinervada o si el proceso de desinervación se produce gradualmente (Rubel y col. 1981). Por último, la desinervación puede producir la muerte de la célula o *degeneración transneuronal* (Cowan 1970), que se ha evidenciado en el núcleo geniculado (Matthews y col. 1960), bulbo olfatorio (Matthews y Polwell 1962), corteza piriforme (Heimer y Kalil 1978) y núcleo mamilar medial (Ginsberg y Martin 2002). Es notorio que no todos los tipos de neuronas responden tan dramáticamente a la desinervación; por ejemplo, el núcleo coclear ventral no se ve sustancialmente afectado (Powell y Cowan 1962). Los estudios realizados en la ME han producido resultados controvertidos, existiendo trabajos que demuestran muerte transneuronal y alteraciones estructurales de las MNs en humanos (Hunter y Ashby 1984; Chang 1998) y en ratas (Eidelberg y col. 1989) después de una

lesión medular; pero también hay varios trabajos que niegan pérdida o alteración crónica de las MNs en humanos (Kaelan y col. 1988), rata (McBride y Ferriga 1991) o ratón (Bjugn y col. 1997).

### 1.3.3 Crecimiento axonal y sinaptogénesis reactiva

Después de hemisección medular torácica, se ha observado la recuperación progresiva de los terminales sinápticos en la médula lumbar hasta valores normales (Nacimiento y col. 1995). Estos terminales se forman a partir de las neuronas presinápticas que no fueron axotomizadas y se pueden originar por dos mecanismos: 1) *Sinaptogénesis reactiva* por brotes sinápticos terminales, ó 2) *Colateralización axonal* con crecimiento de las nuevas ramas axonales por varias micras hasta establecer contacto con la neurona postsináptica (Selzer, 2006).

La *sinaptogénesis* es un proceso fisiológico que tiene lugar durante las fases intermedias del desarrollo. La *sinaptogénesis reactiva* ocurre cuando una lesión u otro estímulo distinto al desarrollo normal desencadena la formación de nuevas sinapsis y reestructuración de los circuitos neuronales existentes, y emplea mecanismos similares a los fisiológicos (Matthews y col. 1976). En el proceso de reconstrucción o recuperación postlesión que conduce a la formación de nuevas sinapsis, los *elementos presináptico* y *postsináptico* desempeñan un papel esencial. Los axones de neuronas supervivientes al daño neural constituyen el *elemento presináptico* que, atraídos por factores liberados por astrocitos o neuronas parcialmente desinervadas forman los nuevos brotes terminales o ramas colaterales. El *elemento postsináptico* también es muy dinámico, empezando por una reorganización masiva del árbol dendrítico como consecuencia de la desinervación. En determinadas neuronas del cerebro, como las del núcleo talámico o de la corteza cerebelar donde después de una axotomía no existe generación de colaterales axonales (Rossi y col. 2006), elementos postsinápticos como dendritas y soma participan activamente en la neosinaptogénesis. En estos casos, existen dos mecanismos de sinaptogénesis reactiva dendrítica: 1) Axonización, con especialización presináptica que da lugar a nuevas conexiones dendro-dendríticas e incluso somato-dendríticas; y 2) Atrofia gradual del árbol dendrítico con incremento de la densidad relativa de

inervación por las aferentes indemnes (Somogyi y col. 1987). Estudios de sinaptogénesis reactiva después de una lesión parcial en el giro dentado demuestran la importancia de la interacción coordinada de neuronas y glía para este fenómeno (Collazos-Castro y Nieto-Sampedro 2001). Las nuevas conexiones que se forman no reemplazan las que se han perdido pero evitan la atrofia del árbol dendrítico, incluso podrían competir con las colaterales regenerativas evitando una recuperación funcional correcta (Collazos-Castro y Nieto-Sampedro 2001). La existencia de fenómenos de sinaptogénesis reactiva en la ME ha llevado a mucha controversia entre distintos investigadores (Nacimiento y col. 1997). Tras la lesión medular en roedores se ha encontrado plasticidad anatómica en los axones propioespinales y reticuloespinales (Bareyre y col. 2004; Courtine y col. 2008). En primates se ha observado recuperación locomotriz y de la manipulación después de una lesión parcial de la ME, asociada con colateralización y sinaptogénesis reactiva de los axones no lesionados del tracto corticoespinal (Rosenzweig y col. 2010). Dos semanas después de la lesión se observó una reducción del 75 % de las sinapsis corticoespinales, que a las 24 semanas se recuperó a más de la mitad del valor normal. En la zona intermedia de la sustancia gris caudal a una hemisección en C7 aparecieron colaterales procedentes del fascículo dorsolateral contralateral que se decusan por la comisura medular y conectan con MNs laterales (Rosenzweig y col. 2010). Otros estudios también han detectado sinaptogénesis reactiva del tracto corticoespinal en los segmentos cervicales (Weidner y col., 2001; Fouad y col., 2001) y lumbares (Aoki y col., 1986, Ghosh y col. 2009). Las redes de interneuronas también presentan modificaciones, detectándose un aumento de sinapsis axoaxónicas (Tai y col., 1997), así como un proceso de recambio sináptico transneuronal (Nacimiento y col., 1995b). Estos circuitos reciben especial atención en la actualidad, ya que se modifican con el entrenamiento y facilitan el automatismo locomotor (Edgerton y col. 2001).

## *2. Objetivos*

- 2.1 Identificar los subnúcleos motores que inervan cada fascículo del Tríceps braquial en la rata y describirlos en términos cuantitativos y topográficos.
- 2.2 Comparar diferentes formas de cuantificación de las motoneuronas en las columnas espinales para definir la técnica más eficiente.
- 2.3 Analizar la arquitectura muscular de los fascículos del Tríceps braquial y correlacionarla con las características de los núcleos motores.
- 2.4 Estimar el tamaño promedio de las unidades motoras en cada fascículo del Tríceps braquial.
- 2.5 Desarrollar un modelo de desinervación masiva del núcleo motor del Tríceps braquial por hemisección medular.
- 2.6 Estudiar los cambios sinápticos y la posible degeneración neuronal en el núcleo motor del Tríceps braquial tras la desinervación.
- 2.7 Evaluar los cambios que tienen lugar en las entradas sinápticas a las motoneuronas axotomizadas de diferentes subnúcleos motores.
- 2.8 Identificar y cuantificar las neuronas propioespinales de C1 a C5 que proyectan a los segmentos medulares en los que se encuentran las motoneuronas del Tríceps braquial.

### *3. Materiales y métodos*

Hemos considerado oportuno dividir este apartado en dos. En la primera parte se describen los procedimientos utilizados de forma general para el cuidado de los animales y el procesamiento del tejido. En la segunda parte se detallan cada uno de los experimentos llevados a cabo y las técnicas específicas realizadas.

### **3.1 PROCEDIMIENTOS GENERALES.**

#### **3.1.1. Animales.**

En los experimentos realizados se utilizaron ratas ( $n = 180$ ) adultas macho tipo Wistar (*Rattus norvegicus*) de edades comprendidas entre las 18 - 24 semanas y peso de 400 - 500 g, suministradas por Harlan Ibérica, España. Los protocolos experimentales utilizados cumplieron las directrices establecidas y reguladas por la Unión Europea. En particular, se tuvo en cuenta la Directiva 86/609/CEE, relativa a la protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos, y las modificaciones, ampliaciones y recomendaciones posteriores (90/67/CEE, 2003/65/CE, 2003/584/CE, 2007/526/CE y 2010/63/UE). También se cumplieron las regulaciones españolas, prestando atención especial al Real Decreto 1201/2005 que traspone y desarrolla la Directiva 86/609/CEE, estableciendo las condiciones en que se pueden utilizar animales de experimentación, el registro de establecimientos de cría, suministradores y usuarios de animales de experimentación, y los requisitos de las instalaciones y equipos, tanto humanos como materiales. Así mismo, se atendió al contenido de la Ley 32/2007 en lo referente al cuidado de los animales, la experimentación y el sacrificio.

#### **3.1.2 Anestesia y cuidados pre y post-operatorios.**

Con el fin de evitar sufrimiento a los animales y facilitar su manipulación, todos los procedimientos quirúrgicos se realizaron con los animales bajo anestesia profunda mediante la administración de pentobarbital sódico (Normon) a una dosis de 55 mg / Kg por vía intraperitoneal, mezclado con 0.02 - 0.2 mg / Kg de atropina (Braun) y 5 - 10 mg / Kg de xilacina (Calier). Para evitar estrés a los animales, su manipulación siempre se llevó a cabo con movimientos suaves y en silencio. Para comprobar que el animal estaba suficientemente anestesiado se comprobó el grado de relajación muscular, la



reducción en la frecuencia respiratoria (60 – 70 respiraciones por minuto) y la falta de sensibilidad dolorosa apretando con una pinza en zonas muy sensibles como la parte final de la cola o la zona interdigital de la pata. Generalmente, pasado un periodo de 5 – 10 min. Los animales ya estaban anestesiados y pudimos proceder a preparar al animal para la cirugía. Durante el procedimiento quirúrgico se mantuvo la anestesia profunda mediante la administración de dosis periódicas de los anestésicos cada hora; en la 2ª y 3ª dosis sucesivas se administró un 30 % de las dosis iniciales, en caso de requerir dosis adicionales sólo se administró xilacina.

Para la cirugía, primero se rasuró ampliamente la zona de trabajo y se lavó con suero fisiológico. Luego se colocó al animal sobre un paño limpio y se inmovilizó. Se esterilizó la región de incisión con 3 lavados sucesivos de solución iodada y alcohol al 70 %. Se cubrió al animal con un paño estéril y una apertura suficientemente grande para realizar la cirugía, con el fin de mantener un campo de trabajo lo más limpio posible. Se aplicó en los ojos un ungüento de vaselina para evitar la abrasión e infección de la cornea. Durante el procedimiento quirúrgico se vigiló periódicamente la frecuencia respiratoria y la temperatura corporal del animal mediante una sonda rectal. Una vez finalizada la cirugía, se colocó al animal sobre una manta térmica a 37 °C en una sala tranquila hasta que se despertó totalmente de la anestesia. Como norma general los animales se recuperaron bastante rápido, 1 hora después. Además, su buen estado general hizo innecesaria la administración de líquidos o cuidados complementarios a los de rutina. Inmediatamente después de finalizar la cirugía se administró enrofloxacin (Baytril, Bayer HealthCare; 0.1 ml / Kg) y meloxicam (Metacam, Boehringer Ingelheim; 3 mg / Kg) por vía subcutánea, repitiendo las dosis a las 8 y 16 horas. Se vigió diariamente el estado general de los animales. La primera semana post-cirugía se estabuló solo un animal por jaula y se les administró pienso de lactantes, mucho más agradable y de mayor palatabilidad que el normal. A la semana de la cirugía se quitaron los puntos de sutura (en la mayoría de los procedimientos se realizó una sutura intradérmica y no fue necesario retirarla) y se mantuvieron en parejas hasta su sacrificio.

### **3.1.3 Sacrificio de los animales mediante perfusión por vía transcardiaca.**

Los animales recibieron una dosis letal de pentobarbital sódico (110 mg / Kg) y luego se perfundieron por vía transcardiaca para fijar el tejido adecuadamente. Los animales

profundamente anestesiados se fijaron con tiras adhesivas en una superficie plana sobre una batea. Se les realizó un corte transversal a la altura de la apófisis xifoides del esternón y se cortó diafragma y costillas, exponiendo el corazón. Se introdujo un catéter por el ventrículo izquierdo hasta la aorta que se fijó con la ayuda de una pinza mosquito, y se cortó la aurícula izquierda. Primero se administró una solución salina isotónica con 0.1 % de heparina seguida por una solución de paraformaldehído al 4 % en un tampón fosfato 0.1 M, pH 7.4, o en tampón acetato a pH 6.5 en el caso que el tejido fuera a ser revelado para HRP). La cantidad administrada fue de 0.8 ml de la solución de perfusión por cada gramo de peso del animal. Inmediatamente después del paso de toda la solución, se extrajo la ME y el cerebro completo y se mantuvieron durante un periodo mínimo de 48 h en una solución de sacarosa al 30 % en tampón fosfato (PB) 0.1 M, hasta su procesamiento y corte en crióstato.

#### **3.1.4 Procesamiento histológico del tejido nervioso.**

Todo el tejido neural fue cortado en crióstato (Leica Microsystems, CM1900; Wetzlar, Alemania) y recogido en una solución de tampón fosfato salino (PBS) 0.1 M para eliminar posibles restos del medio de inclusión O.C.T. (Tissue-Tek, cryoblock, 4583).

##### *a) Tinción histológica con Hematoxilina-Eosina (H-E).*

Los cortes se montaron en portaobjetos y se dejaron secar a temperatura ambiente durante 24 horas. Puesto que utilizamos cortes relativamente gruesos (50 – 60  $\mu\text{m}$ ), realizamos una modificación al protocolo de McManus y Mowry (1968) para conseguir que las tinciones penetraran completamente en el tejido. El proceso completo se resume a continuación:

1. Lavado de las muestras: 3 x 10 segundos con agua destilada ( $\text{H}_2\text{O}_d$ ).
2. Eliminación de grasas: solución de etanol y cloroformo 1:1 durante 1 hora.
3. Rehidratación: inmersión durante 2 minutos en soluciones con una proporción descendente de etanol: 100 %, 95 %, 70 %, 50 %. Finalmente, lavado en  $\text{H}_2\text{O}_d$ .
4. Tinción con hematoxilina de Ehrlich durante 1 hora.
5. Lavado de las muestras: 3 x 10 segundos con  $\text{H}_2\text{O}_d$ .

6. Diferenciación: HCl al 1 % en etanol al 70 % durante 10 segundos.
7. Lavado de las muestras: 3 x 10 segundos con  $H_2O_d$ .
8. Tinción azul: Solución de amonio durante 30-90 segundos.
9. Lavado de las muestras: 3 x 10 segundos con  $H_2O_d$ .
10. Contratinción con eosina durante 15 segundos.
11. Lavado de las muestras: 3 x 10 segundos con  $H_2O_d$ .
12. Deshidratación: 3 minutos en soluciones de etanol al 95% y etanol al 100% (2x).  
Paso previo por etanol al 70 % si hay demasiada tinción con eosina.
13. Aclarado: 5 minutos en xileno al 100 % (2x).
14. Montaje de la muestra con Depex (DPX, Panreac).

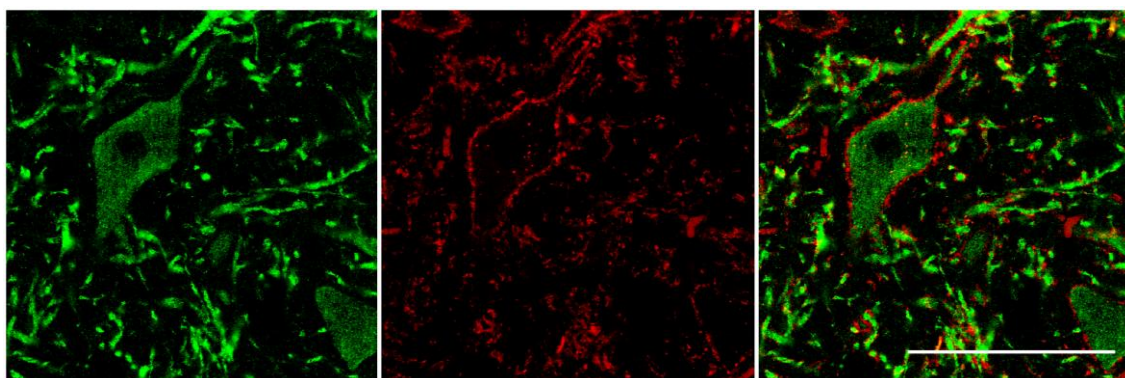
*b) Revelado de trazador HRP.*

El trazador neuronal HRP fue revelado por el método de la tetrametilbencidina (Mesulam, 1982), que aprovecha la actividad enzimática de la peroxidasa. La visualización histoquímica de la enzima se consiguió con la incubación del tejido fijado en un medio con peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), que actúa como sustrato, y el cromógeno soluble tetrametilbencidina (TMB) que precipita y toma un color oscuro al oxidarse. El complejo HRP- $H_2O_2$  produce la reducción del  $H_2O_2$  y libera oxígeno que se combina con el cromógeno obteniendo un pigmento visible y fácilmente detectable tanto a microscopía óptica como electrónica (Carson y Mesulan 1982; Mesulan 1978). El tejido de los animales en los que se utilizó HRP se obtuvo mediante perfusión con solución de paraformaldehído al 4% en tampón acetato 0.1 M, pH 6.5. Después de cortar el tejido en el crióstato se montó en portaobjeto y se dejó secar durante 1 día a temperatura ambiente antes de iniciar el proceso de revelado de la HRP que se describe a continuación. Tras lavar el tejido con  $H_2O_d$  durante 10 segundos, éste se preincubó durante 20 minutos a temperatura ambiente en una cubeta con una solución compuesta por 195 ml de la *solución A* y 5.1 ml de *solución B*, siendo: *solución A*: 100 mg de nitroferriicianuro de sodio (Sigma), 92.5 ml de  $H_2O_d$  y 5 ml del tampón acetato a pH 3.3. *Solución B*: 5 mg de 3,3',5,5'-TMB (Sigma) y 2.5 ml de etanol absoluto. Después, se incubó 20 minutos a temperatura ambiente y en agitación en la solución de reacción, formada por la solución empleada para la preincubación más 6 ml de  $H_2O_d$  al 0.3 %, dando lugar a la reacción enzimática que hace visible del trazador. Tras la reacción se

lavó el tejido 4 veces (7 minutos cada uno) a 4 °C en una solución de tampón acetato pH 3.3 al 24 % en H<sub>2</sub>O<sub>d</sub>. Las muestras se deshidrataron haciéndolas pasar durante 3 minutos por soluciones con una proporción ascendente de etanol desde un 70 % hasta el 100 % y luego se aclararon con el paso por dos soluciones de xileno al 100 % durante 5 minutos cada una, y finalmente se montaron en DPX. Este procesamiento no afectó la visualización ni intensidad del marcaje de trazadores fluorescentes cuando se emplearon ambas técnicas (Gordon y col. 1991, Gordon y Richmond 1990, Crockett y col. 1987).

*c) Procesamiento inmunohistoquímico para sinaptofisina.*

El protocolo inmunohistoquímico para revelar la sinaptofisina fue similar en todos los casos, cambiándose solamente los anticuerpos secundarios utilizados. Para medir los cambios sinápticos después de una hemisección cervical se empleó IgG de cabra anti-IgG de ratón, conjugado con Alexa Fluor 594 (Invitrogen). En el experimento para medir el efecto de la axotomía sobre la densidad sináptica se empleó IgG de cabra anti-IgG de ratón, conjugado con Alexa Fluor 488 (Invitrogen). Este procesamiento se hizo tanto en tejido montado en un portaobjeto como en suspensión en una solución de PBS 0.1 M. La apariencia de la sinaptofisina en el asta ventral de una médula normal se muestra en la Fig. 3.1.



**Figura 3.1.** Apariencia de la tinción inmunohistoquímica para sinaptofisina sobre las motoneuronas de la médula espinal a nivel cervical en la rata normal. **A)** Somas neuronales y dendritas en la lámina 9 teñidas para MAP2. **B)** Tinción para sinaptofisina. **C)** Imagen compuesta. Obsérvese que la sinaptofisina se encuentra en numerosas estructuras con forma de botones sinápticos alrededor del soma y de las dendritas. La escala representa 50  $\mu$ m.

Los principales pasos de la tinción se describen a continuación:

1. Lavado del tejido en PBS 0.1 M; 3 lavados de 5 minutos en agitación, a temperatura ambiente.
2. Incubación durante 30 minutos en agitación y a temperatura ambiente de las muestras en una solución compuesta por PBS 0.1 M, 5 % de suero normal de cabra (NGS, Gibco, 16210-064; Paisley, Reino Unido) y 0.2 % de Tritón (Sigma, X-100: St. Louis, Missouri USA).
3. Lavado del tejido en PBS 0.1 M; 3 lavados durante 5 minutos en agitación, a temperatura ambiente.
4. Incubación con el anticuerpo primario monoclonal anti-sinaptofisina (Sigma, S 5768) diluido 1:500 en una solución de PBS 0.1 M, con 1 % de NGS y 0.2 % de tritón. Se dejó durante toda la noche en agitación y a temperatura ambiente.
5. Lavado del tejido en PBS 0.1 M; 3 lavados durante 5 min. en agitación, a temperatura ambiente.
6. Incubación con el anticuerpo secundario Anti-IgG de ratón hecho en cabra, conjugado con Alexa 488 o 594 (Molecular Probes - Invitrogen, Holanda) en PBS 0.1 M, durante 3 h a temperatura ambiente, en agitación y oscuridad.
7. Lavado del tejido en PBS 0.1 M; 3 lavados de 5 min. en agitación, a temperatura ambiente y oscuridad.
8. Paso a un porta-objetos, deshidratación en etanol, aclarado en xileno y montaje en DPX.

### **3.1.5 Trazadores neuronales.**

Antes de iniciar los experimentos se utilizó un grupo de animales ( $n = 15$ ) para seleccionar los trazadores más eficaces y definir el tiempo de supervivencia óptimo del animal. Se realizaron varias pruebas para prevenir que el modo de aplicación del trazador, su velocidad de transporte y espectro óptico interfiriera con otros trazadores o introdujera errores en la cuantificación de las MNs. Finalmente seleccionamos 5 trazadores para el marcaje retrógrado de los grupos específicos de neuronas. Las principales características de estos trazadores se resumen en la *tabla 3.1*.

TRAZADORES NEURONALES					
	<i>Dextran tetrametilrodamina</i>	<i>Fast blue</i>	<i>Dextran alexa 488</i>	<i>Amino estilbamidina metanosulfonato</i>	<i>Peroxidasa de Rábano Picante grado I</i>
Abreviatura	DTMR	FB	DA	AB	HRP
<b>Transporte neural</b>	Anterógrado (retrógrado por axotomía).	Retrógrado.	Anterógrado (retrógrado por axotomía).	Principalmente retrógrado.	Retrógrado.
<b>Peso molecular (MW)</b>	3000	~ 400	10000	282	44173
<b>Captación placa neuromuscular</b>	No	Poco	No	Si	Muy poco
<b>Longitudes de onda (nm) (excitación / emisión) utilizadas en este trabajo para visualizar el trazador</b>	555/580	405/420	495/519	405/440	Revelado con TMB. Luz transmitida.
<b>Dilución de uso y solvente utilizado</b>	10 % en PBS 0.1 M.	2 % en solución salina al 0.9 %.	5 % en PBS 0.1M.	4 % en solución salina al 0.9 %.	30 % en solución salina al 0.9 %.
<b>Casa comercial</b>	Molecular Probes (D3308).	Polysciences (17740).	Mol. Probes (D22910).	Molecular Probes (A22850).	Roche (108090).

**Tabla 3.1.** Características de los trazadores neurales utilizados.

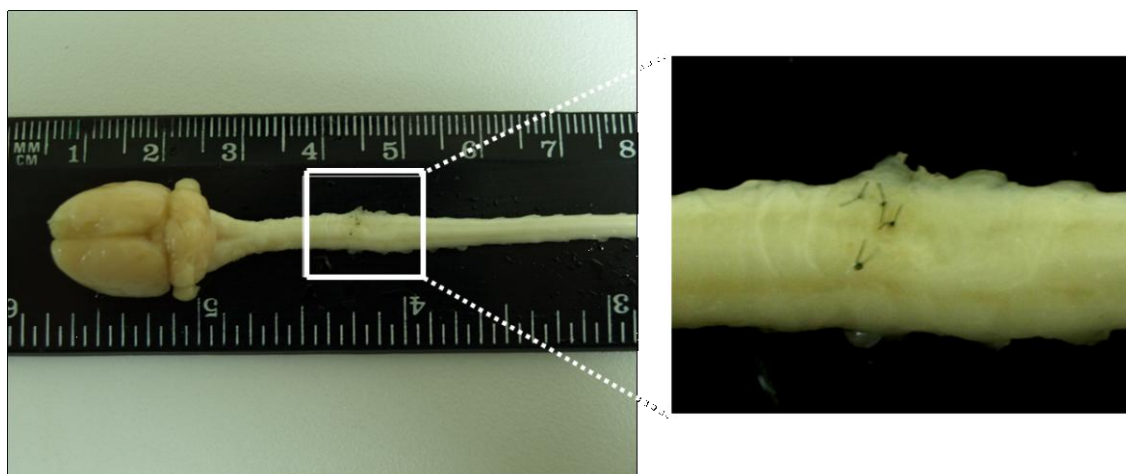
### 3.1.6 Modelo de lesión de la ME

En esta tesis estandarizamos un modelo de lesión medular parcial en rata mediante hemisección del lado derecho en el segmento medular C6. Aunque el animal padece inicialmente una grave hemiplejia derecha, sus funciones fisiológicas básicas (alimentación, respiración, micción) no se afectan de forma importante lo que facilita su

manejo y recuperación. La hemiplejia pasa a ser una hemiparesia 2 a 3 días después de la lesión, lo que asegura la supervivencia del animal en muy buen estado general.

#### *Procedimiento quirúrgico.*

Con el animal en anestesia profunda, se rasuró la región dorsal del cuello, desde la región occipital hasta la escapular. El animal se colocó en decúbito prono con las extremidades anteriores sujetas en extensión. Se le realizó una incisión en la piel siguiendo la línea media, y se profundizó separando las distintas capas musculares del cuello hasta llegar a las apófisis espinosas de las vértebras cervicales. Con ayuda de un separador obtuvimos un campo lo suficientemente grande para trabajar e identificar la zona de interés tomando como puntos de referencia las prominentes apófisis espinosas de la segunda vértebra cervical y de la segunda vértebra torácica. Ésta última se cortó para facilitar la manipulación posterior y se identificó la quinta vértebra cervical bajo la cual se localiza el segmento medular C6. A partir de este momento comenzamos a trabajar utilizando una lupa binocular estereoscópica (Leica Microsystems, S6E; Wetzlar, Alemania) junto con una fuente de iluminación. Se realizó una hemilaminectomía derecha de la vértebra C5, la duramadre se abrió con un pequeño corte transversal. La vena dorsal espinal se cauterizó justo en el sitio a realizar la lesión, aproximadamente en el tercio medial del segmento. Tomando como referencia la zona en que se distribuye la raíz dorsal para determinar la altura del segmento y como punto medio de la ME el recorrido de la vena dorsal espinal, se seccionó la hemimédula derecha. El corte se hizo con unas micro-tijeras de punta recta que se introdujeron perpendicularmente a la ME, iniciándose el corte en el punto medio hasta la región más lateral. Tras el primer corte, nos aseguramos que la hemisección es completa realizando un segundo o tercer corte. Posteriormente se aproximaron los bordes de la duramadre con puntos simples (Fig. 3.2) empleando una sutura monofilamento no reabsorbible de 9-0 (Ethilon, Johnson & Jonson). Los músculos se suturaron respetando las distintas capas y con una sutura continua intradérmica se aproximaron los bordes de la piel. Se realizaron controles postoperatorios rigurosos para evitar posibles complicaciones (infecciones o dolor neuropático) y estudiar la evolución de las lesiones.



**Figura 3.2.** A) Apariencia macroscópica del cerebro y la ME de una rata con hemisección cervical C6 derecha y duroplastia, fijada con paraformaldehído 6 semanas después de la lesión. **B)** Detalle de la zona de la lesión, aún se observan los puntos de sutura en la duramadre.

### 3.1.7 Cuantificación y procesamiento de las imágenes.

Se emplearon técnicas de microscopía de luz transmitida, fluorescencia y confocal para la visualización de los diferentes tipos de muestras de tejido, que más adelante se explican pormenorizadamente para cada experimento. En todos los casos las cuantificaciones se hicieron sobre imágenes con un tamaño mínimo de 1024 x 1024 píxeles, procesadas siempre de la misma forma para efectos de comparaciones de intensidad. Cuando la intensidad de color en las imágenes no era relevante, estas se optimizaron en contraste y brillo para una mejor visión, utilizando los programas de procesamiento de imágenes Photoshop e ImageJ (1.42q, NIH, Bethesda, MD). También se utilizaron estos programas para realizar los montajes y paneles de imágenes que aparecen en este documento.

### 3.1.8 Procesamiento estadístico de los datos.

Los datos obtenidos se analizaron con el programa SigmaPlot v. 9.0.1 (Systat Software, Richmond, CA, USA). Se utilizó la prueba *t de Student* para comparar el valor medio de dos grupos, como por ejemplo entre las MNs que inervan el TB de la extremidad derecha e izquierda; y el *análisis de varianza (ANOVA) de una vía* con el



postest de Dunn o el de Holm-sidak para comparar los valores medios de tres o más grupos, tal como las cuantificaciones del número de neuronas que inervan cada fascículo del TB y el tamaño medio y composición de sus fibras musculares. También hemos empleado *ANOVA de dos y tres vías* para comparar y detectar diferencias entre tres o más grupos con respecto a dos o tres factores, por ejemplo la localización o tiempo de lesión entre diversos grupos de neuronas. Todos los datos se presentan como la *media ± error estándar* (SEM). Se consideró que había diferencias entre los grupos comparados cuando  $p < 0.05$ .

### **3.2 DISEÑOS EXPERIMENTALES Y CUANTIFICACIONES.**

#### **3.2.1 Marcado retrógrado del núcleo motor del TB en la rata**

Las MNs que inervan cada fascículo del TB fueron estudiadas mediante técnicas de marcaje retrógrado único y múltiple en una o ambas extremidades del animal, gracias al uso combinado de trazadores que podían ser fácil e inequívocamente distinguibles entre sí. La posibilidad de realizar este tipo de marcaje permitió reducir el número de animales requeridos y que cada animal sirviera de control de sí mismo, proporcionando información más completa y disminuyendo la variabilidad y el error de los datos.

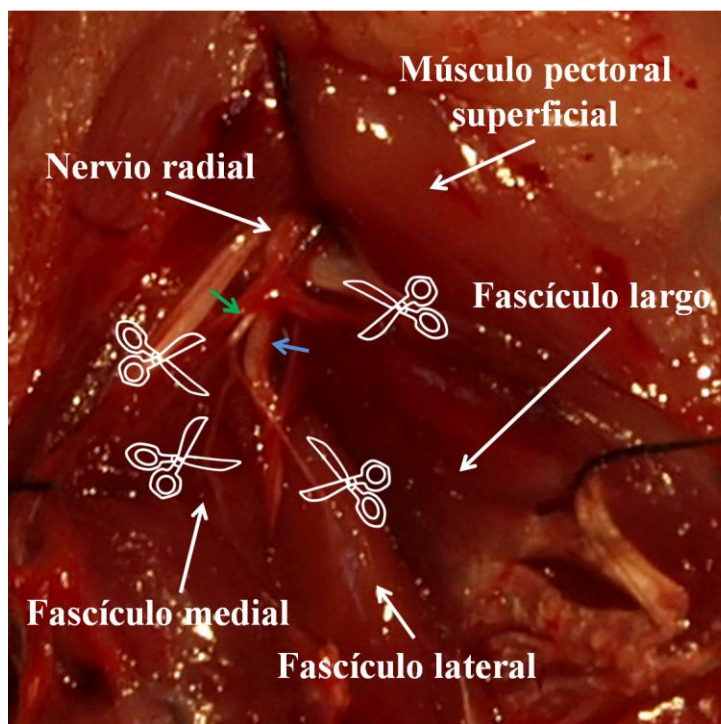
##### *a) Técnicas de marcaje retrógrado:*

A continuación se describen las dos técnicas empleadas para el marcaje retrógrado de las MNs del TB. En ambas técnicas se estableció un periodo de 3 días antes del sacrificio de los animales para obtener un marcaje óptimo de las neuronas.

##### *Por axotomía del nervio periférico.*

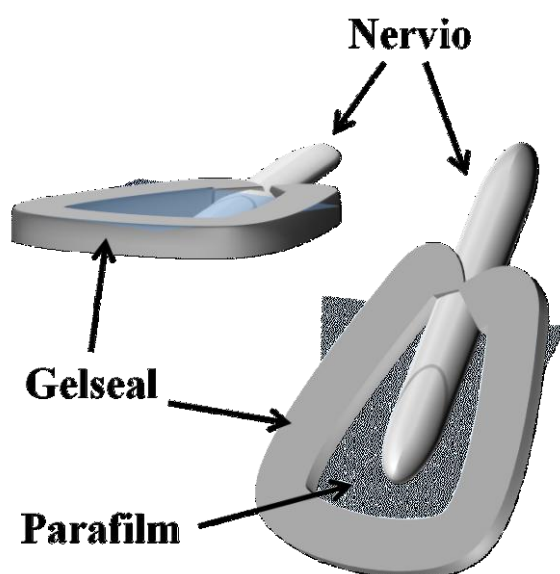
Ha sido la técnica de elección para realizar la identificación de los distintos grupos de MNs. Con el animal en anestesia profunda se rasuró la cara interna de ambas extremidades anteriores y se le colocó en decúbito supino con las extremidades anteriores en máxima extensión e inmovilizadas mediante una cinta adhesiva. Se comenzó la cirugía con una pequeña incisión en la fosa axilar, se separó

progresivamente el tejido conectivo hasta identificar el paquete vascular y nervioso, así como la musculatura de la zona y muy especialmente los tres fascículos del TB. El músculo pectoral superficial se apartó con ayuda de una sutura para visualizar apropiadamente la arteria humeral y el nervio radial. Este último también inerva al músculo tensor de la fascia del antebrazo que se retiró para poder abordar adecuadamente al fascículo largo, ya que se encuentra cubriendo gran parte de este fascículo. La primera rama que da el nervio radial es bastante gruesa y se queda en la región rostral del fascículo largo, dividiéndose en dos al entrar en él. De esta rama se origina un pequeño nervio que se dirige superficialmente para inervar el tensor de la fascia del antebrazo, que se deja indemne. Seguidamente el radial se divide en dos ramas asimétricas. La rama de mayor tamaño profundiza hacia el codo para dirigirse al antebrazo y los dedos, dando otras ramas que inervan distintos músculos a su paso. La rama de menor tamaño se extiende por la superficie del fascículo medial en contacto con el largo y se divide en dos. Una continúa su paso por la superficie del medial ramificándose y penetrando en el músculo. La otra rama muy fina se dirige hacia capas más profundas alcanzando al fascículo lateral, pero antes da una rama más que penetra en el medial. Aunque este es el esquema general de aparición de las distintas ramas existen pequeñas modificaciones individuales. En la Fig. 3.3 se muestran como se distribuyen las ramas del nervio radial entre los fascículos del TB en la rata.



**Figura 3.3.** Inervación del TB por el nervio radial, en una vista medial a la altura de la fosa axilar de la rata. El pectoral se ha retirado del campo con la ayuda de una sutura. Los 3 fascículos del TB han sido desinsertados para facilitar su identificación, y el largo se ha apartado. Las tijeras señalan la zona de corte de los nervios para aplicar los trazadores neurales justo antes de su entrada en los fascículos. Nótese las dos ramas que inervan el medial.

Una vez que se identificaron todas ramas se cortó cada nervio justo a la entrada del músculo y se aplicó el trazador en el extremo del nervio cortado. Para esto, el nervio cortado se colocó en el centro de un pequeño fragmento de parafilm (Pechiney plastic packaging, Chicago) y se rodeó de una capa de gel (gelseal, Amersham Biosciences, San Francisco, CA), creando un pequeño reservorio para contener al trazador (Fig. 3.4). Fue importante evitar que el borde cortado del nervio entrara en contacto con el gel porque se afectaba gravemente la captación del trazador. Dentro del reservorio se colocaron 5  $\mu$ l de trazador cubriendo totalmente el extremo del nervio. Se verificó que no existieran fugas del trazador y se dejó en contacto el nervio con el trazador durante una hora cubriendo la zona de incisión con una gasa humedecida con suero fisiológico para prevenir la evaporación. Trascurrido el tiempo establecido, se retiró el contenedor y el trazador evitando su difusión y posible captación por otras neuronas que inervan estructuras adyacentes. Con la ayuda de un hisopo empapado en suero fisiológico se eliminaron posibles restos de trazador en el extremo del nervio. Este proceso se repitió en cada una de las ramas que inervan los fascículos. En el caso del marcaje único, se colocaron juntos todos los extremos de los nervios cortados en el contenedor y se aplicó el trazador. Con el fin de acortar los tiempos de cirugía se realizó simultáneamente el marcaje en ambas extremidades. Una vez finalizados todos los marcajes, se suturaron las estructuras musculares en los diferentes planos y la piel.



**Figura 3.4.** Reservorio para contener el trazador. El extremo proximal del nervio se colocó sobre una base de parafilm y se rodeó con una capa de gelseal, obteniéndose un contenedor estanco donde se introdujo una pequeña cantidad del trazador cubriendo totalmente el extremo del nervio.

*Por inyección intramuscular.*

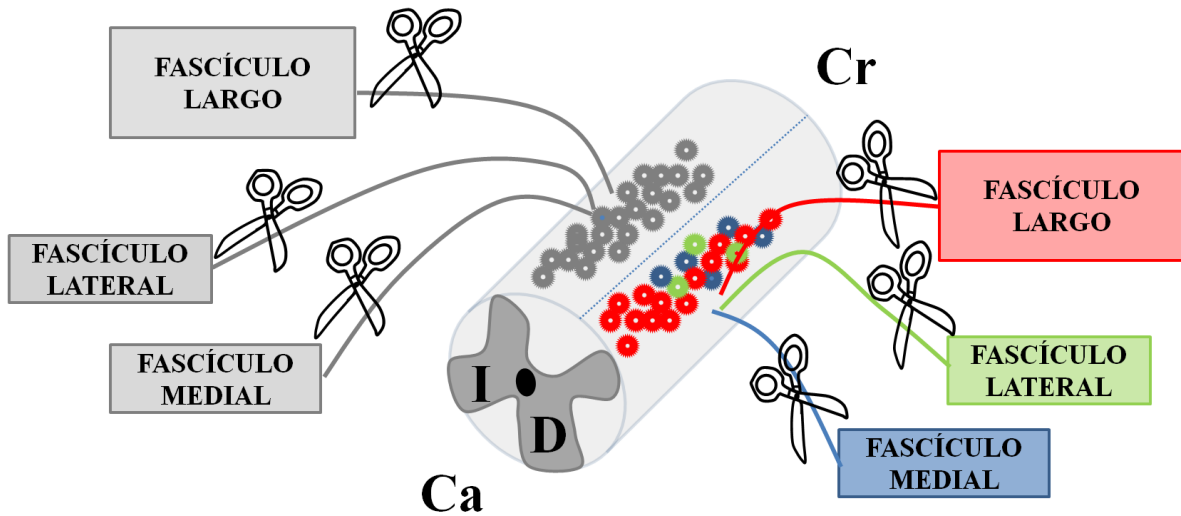
Esta técnica fue empleada para comprobar la certeza del marcaje por axotomía y para comparar los cambios sinápticos en la neurona marcada con o sin axotomía, experimentos que se describen en apartados posteriores. El animal se colocó en decúbito prono con la extremidad elevada y flexionada gracias a un rulo de gasas colocado debajo. Se realizó un pequeño corte de la piel justo encima del codo que permitió la identificación del grueso tendón que forma el TB y su inserción sobre el olécranon, distinguimos los tres fascículos y los tendones justo antes de unirse. Cortamos la formación tendinosa que surge independientemente del fascículo lateral. Con ayuda de unas pinzas se levantó el fascículo y se introdujo lentamente una microaguja roma (jeringa Hamilton) hasta el origen del músculo, paralelamente a las fibras musculares, y se liberó el trazador retirando progresivamente la aguja del músculo. La operación se repitió en distintas regiones superficiales y profundas del fascículo hasta liberar un volumen total de 5 µl del trazador. Posteriormente se cortó el tendón del fascículo largo y se procedió de igual manera, pero inyectando 22 µl del trazador. Por último, se identificó y cortó el tendón del fascículo medial y se inyectó un volumen total de 4 µl del trazador. Los volúmenes de trazador a inyectar se calcularon de acuerdo con el peso de cada fascículo. Todos los tendones seccionados se suturaron y los bordes de la piel se aproximaron.

*b) Identificación de los subnúcleos motores.*

*Experimento 1: cuantificación de las MNs que inervan cada fascículo.*

Se estudió la distribución general de cada subgrupo de MNs a lo largo de todo el núcleo motor y el tamaño de la columna de MNs que inerva cada fascículo empleando de la técnica de marcaje por axotomía en un total de 8 animales. En la extremidad derecha se marcó independientemente cada grupo utilizando DTMR, FB y DA para marcar las MNs que inervan los fascículos largo, medial y lateral, respectivamente (Fig. 3.5). En la extremidad izquierda se llevó a cabo un marcaje único de las MNs que inervan todo el músculo utilizando como trazador el HRP. El tejido se incluyó como un

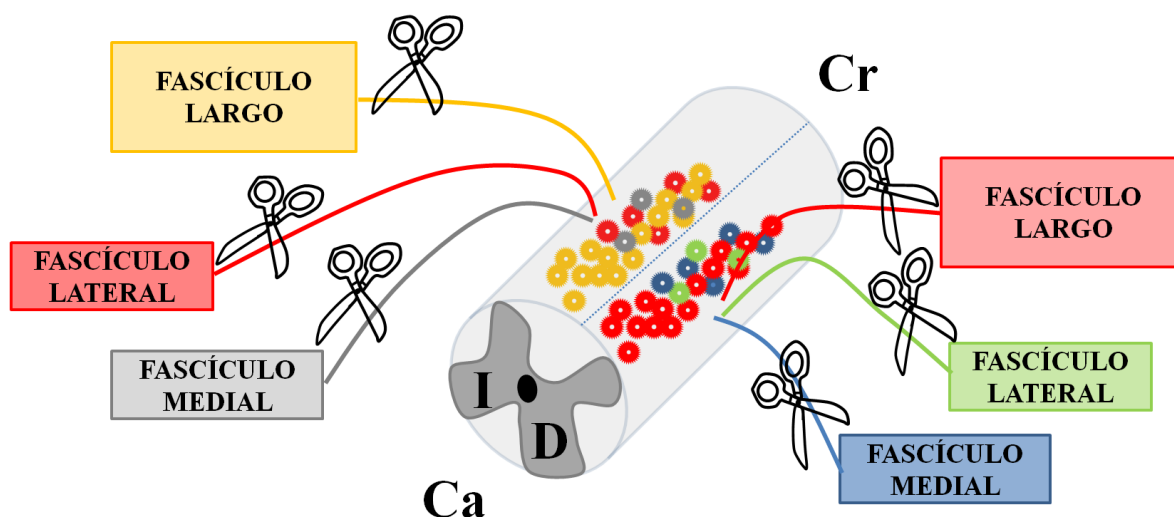
único bloque desde C6 hasta T1 y se cortó longitudinalmente a 60  $\mu$ m, marcando el inicio de cada segmento con un pinchazo de aguja hipodérmica.



**Figura 3.5.** Trazadores utilizados en el experimento 1. En la extremidad anterior derecha se aplicaron los trazadores DTMR (rojo), DA (verde) y FB (azul) para el trazado retrógrado por axotomía del nervio de los diferentes fascículos del TB. En la extremidad izquierda se empleó HRP (gris) para el marcar las MNs de todos los fascículos.

#### Experimento 2: Distribución segmentaria de las MNs.

En otros 6 animales realizamos un triple marcaje bilateral con el propósito de analizar la distribución segmentaria de los subnúcleos de MNs y su localización respecto a los ejes dorsoventral y mediolateral. En la extremidad derecha, DTMR, FB y DA se utilizaron para el marcaje específico de las MNs que inervan los fascículos largo, medial y lateral, respectivamente; mientras que en la extremidad izquierda los mismos fascículos se marcaron utilizando los trazadores AB, DTMR y HRP, respectivamente (Fig. 3.6). Los segmentos medulares desde C6 hasta T1 fueron identificados y cortados independientemente en el eje transversal, se realizó una pequeña incisión en el borde dorsal derecho antes del procesamiento histológico con el fin de poder distinguir entre el lado derecho e izquierdo en la médula.



**Figura 3.6.** Trazadores utilizados en el experimento 2. En la extremidad anterior derecha se aplicaron los trazadores DTMR (rojo), DA (verde) y FB (azul). En la extremidad izquierda se emplearon los trazadores AB (amarillo), DTMR (rojo) y HRP (gris).

### *Experimento 3: Medición de los perfiles neuronales de los subnúcleos del TB.*

Se utilizó un grupo de 4 animales para calcular la proporción de  $\gamma$ -MNs en cada fascículo. La estimación se hizo partiendo del supuesto de que el área de sus somas es inferior a  $500 \mu\text{m}^2$  (Swett y col. 1986; Ishihara y col. 2006; Roy y col. 2007). Se utilizó DTMR para marcar las MNs que inervan los fascículos medial y lateral en el mismo animal en extremidades contralaterales evitando así posibles artefactos asociados al trazador o al procesamiento del tejido. Se tomó un bloque desde C6 hasta T1 y se cortó horizontalmente a  $60 \mu\text{m}$ . Las cuantificaciones del área se llevaron a cabo en imágenes de  $2776 \times 2074$  píxeles tomadas con un objetivo de 20 aumentos y un sistema de microscopia de imagen digital (Olympus Europa Holding GmbH, DP50; Hamburg Alemania). Las imágenes obtenidas se calibraron utilizando el programa de procesamiento de imágenes Analysis (Soft Imaging System, Alemania), y con el mismo se midió el área del soma dibujándole una línea alrededor. Sólo se midieron las neuronas con el núcleo visible para evitar errores por cuantificación de fragmentos del soma alejados del plano ecuatorial. Se calculó el área media para las neuronas de los subnúcleos de los fascículos lateral y medial, así como el porcentaje de neuronas de cada fascículo que presentaba un área inferior a  $500 \mu\text{m}^2$ .

c) Metodología de cuantificación del número de MNs:

En este trabajo hemos comparado 3 métodos de cuantificación de las MNs espinales, con el interés de verificar los datos obtenidos a la vez que definir la mejor metodología para estudios posteriores.

*Cuantificación simple.*

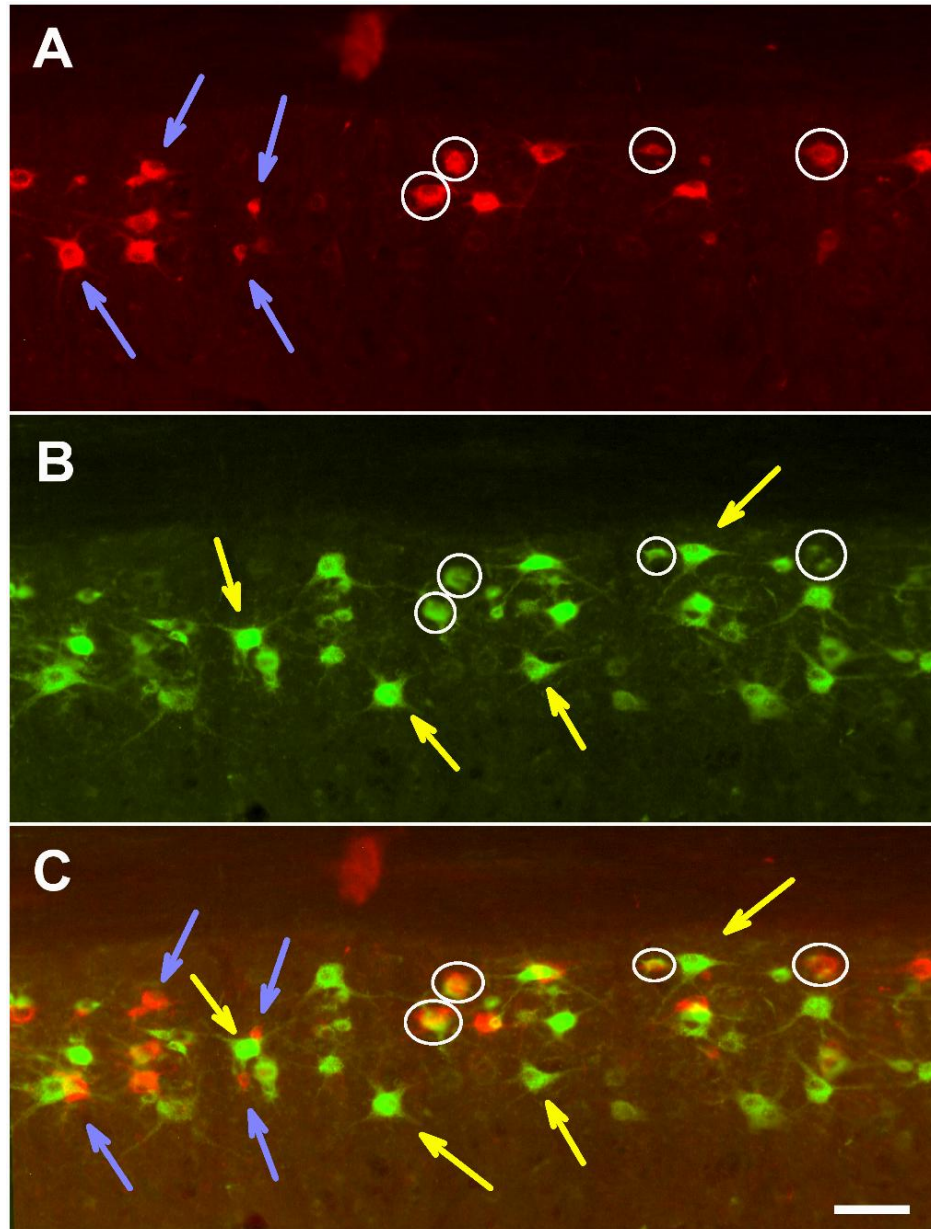
Se utilizaron todos los cortes seriados del tejido y se contaron todos los perfiles de neuronas marcadas con alguno de los trazadores y que presentaban núcleo o al menos dos dendritas visibles. Se utilizaron cortes relativamente gruesos (60  $\mu\text{m}$ ) para reducir en lo posible el error por cuantificación doble de una misma neurona en cortes contiguos (Swett y col. 1986; West 1999). Ha sido la técnica de elección habitual por su simplicidad. La cuantificación de los perfiles neuronales marcados para cada trazador se llevó a cabo en imágenes de gran tamaño (4080 x 3072 píxeles) capturadas con un microscopio de fluorescencia con Zoom Macro (MVX10 Macroview, Olympus, Hamburgo, Alemania) equipado con una cámara digital DP71 (Olympus). El programa de procesamiento de imágenes Cell<sup>A</sup> (Olympus Soft Imaging Solutions) fue utilizado para optimizar el contraste y brillo de las imágenes capturadas y facilitar la identificación de los distintos tipos grupos de neuronas.

*Cuantificación del número absoluto de MNs.*

Este método lo utilizamos en el experimento 1, en el que la médula fue cortada longitudinalmente de manera que cada columna de MNs sólo aparecía en 5 - 6 secciones consecutivas del tejido. Este pequeño número de secciones hizo posible contar el número real o absoluto de MNs marcadas para cada fascículo, a través de la identificación y descarte de los perfiles neuronales marcados que aparecen en más de un corte contiguo. A partir de las mismas fotos utilizadas para la cuantificación simple pero tomadas para cada subgrupo neuronal, se transformaron las fotos a escala de grises y se invirtieron los colores, apareciendo las MNs como figuras negras sobre un fondo blanco. Todas las imágenes obtenidas fueron impresas en láminas transparentes formando tiras fácilmente manipulables. Tomando como punto de referencia vasos



sanguíneos u otras marcas del tejido que se continuaban de una muestra a la siguiente, pudimos obtener una superposición precisa de cortes contiguos e identificar fácilmente los perfiles de neuronas repetidos (Fig. 3.7).



**Figura 3.7.** *Método de cuantificación absoluto de las MNs del TB.* **A)** y **B)** muestran dos cortes horizontales consecutivos de la ME con MNs del fascículo largo marcadas con DTMR. En la imagen **A** se ha mantenido el color rojo original del trazador y en la imagen **B** el rojo aparece transformado al pseudocolor verde. Las flechas señalan perfiles neuronales que sólo aparecen en uno de los cortes, y los círculos rodean neuronas que aparecen en ambos cortes. En **C)** se han mezclado las dos imágenes para identificar fácilmente los fragmentos neuronales que aparecen en los dos cortes y evitar que sean cuantificados dos veces. La escala representa 100  $\mu\text{m}$ .



*Cuantificación estereológica.*

En el experimento 2, el método de cuantificación absoluta dejó de ser práctico debido al elevado número de cortes transversales obtenidos (más de 100 secciones para cada columna de neuronas). Aplicamos entonces una estrategia estereológica para comprobar la veracidad de los datos obtenidos por el método simple en este experimento. Seleccionamos 1 de cada 10 cortes con un inicio aleatorio para cada animal. Los cortes se visualizaron en el microscopio confocal (TCS SP5, Leica Microsystems CMS GmbH; Wetzlar, Alemania), empleando los láseres de excitación diodo 405 nm, Argón con línea de 488 nm y HeNe con línea de 543 nm, y capturando las imágenes con tamaño de 1024 x 1024 píxeles. Se obtuvieron secciones ópticas desde la parte más superficial del corte a la más profunda con un intervalo de 3  $\mu\text{m}$  y se procesaron con el programa Leica LAS AF Lite (Leica Microsystems CMS GmbH). El número total de neuronas fue estimado usando el núcleo como *unidad de medida estereológica* (West y Gundersen 1990; Negredo y col. 2004) y una modificación del *fraccionador óptico*. El fraccionador óptico combina el *disector óptico* con un sistema de muestreo fraccionado y se utiliza frecuentemente para la cuantificación de células (Pakkenberg y Gundersen 1988; West y col. 1991; West 1993; Negredo y col. 2004). Sin embargo, se sabe que la precisión del disector óptico se afecta por los fenómenos de encogimiento progresivo del tejido como consecuencia del procesamiento histológico (Dorph-Petersen y col. 2001), de manera que la contribución de cada sección a la estimación del número de células debe ser ponderada en función del grosor final de la sección. Para la cuantificación del encogimiento, se asume que las secciones se cortan al valor puesto en el crióstato y que la diferencia entre el grosor inicial y el medido se debe a los procesos de recolección, secado, tinción, deshidratación y montaje que sufrió el tejido. En concordancia con trabajos previos (Dorph-Petersen y col. 2001; Negredo y col. 2004), encontramos que en las secciones congeladas la reducción del grosor fue grande y de forma desigual, produciendo variaciones sustanciales en las mediciones de espesor (35 a 62 %). Por consiguiente, en este trabajo hemos optado por mejorar la precisión de la estimación estereológica del número de MNs examinando todos los disectores ópticos obtenidos de los cortes de tejido seleccionados. Esta variante es más apropiada para cuantificaciones de pequeñas estructuras que contienen tan sólo algunos cientos de neuronas (West 1999).

Como resultado, el número total de MNs ( $MN_n$ ) en la columna se obtuvo del producto de la densidad de MNs en la muestra ( $N_v$ ) y el volumen de la columna de MN ( $V_{col}$ ):

$$MN_n = N_v V_{col} \quad (1)$$

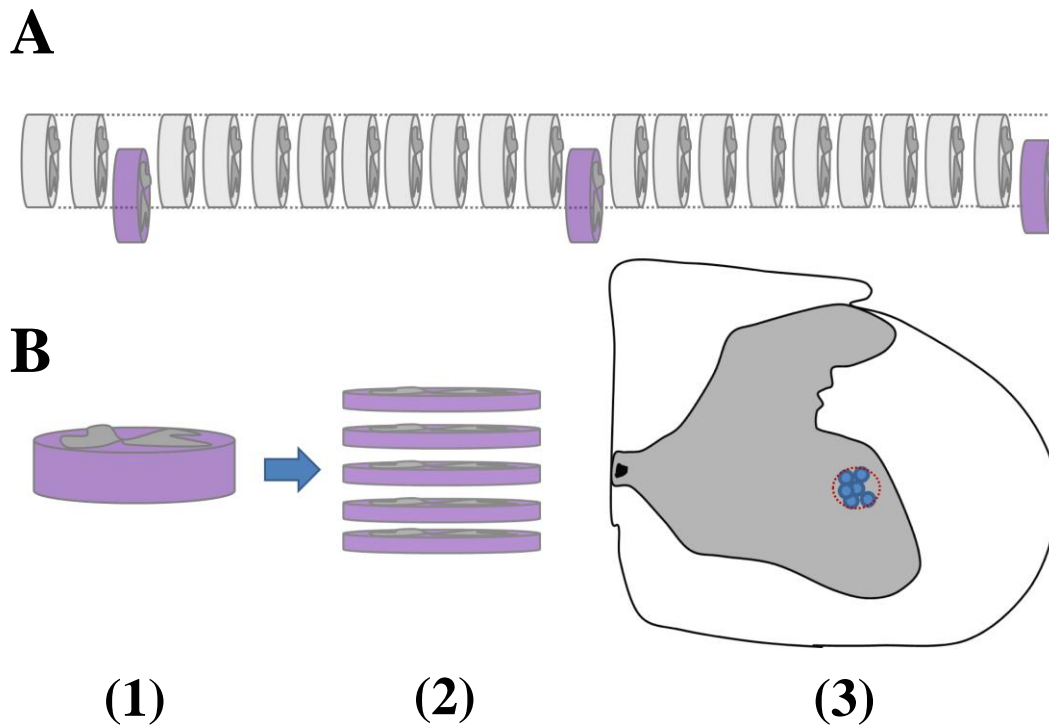
Siendo

$$N_v = \frac{\sum Q}{\frac{s_n}{\sum BA(a_s)} s_l} \quad (2)$$

En donde  $\sum Q$  es el número total de MNs contadas en todos los disectores,  $BA$  es el valor que avanzó el bloque en cada corte, en nuestro caso 60  $\mu m$ , que se estableció en el crióstato calibrado; y  $a_s$  es el área transversa ocupada por la columna de MNs, definida como el área del círculo de menor radio que encerraba al grupo de somas de las MNs en cada sección de tejido cuantificado (Fig. 3.8).

La estimación del volumen de la columna de MNs para cada fascículo muscular se realizó utilizando el *principio de Cavalieri*. Para ello, todas las secciones seriadas comprendidas entre los segmentos C6 a T1 de la ME fueron visualizadas con el microscopio de fluorescencia. La sección inicial ( $s_i$ ) y la última sección ( $s_f$ ) en las que aparecen MNs de un determinado fascículo del músculo definió la longitud de la columna en cada animal. El volumen de la columna de MNs se obtuvo multiplicando la longitud de la columna por el valor medio de las  $a_s$  áreas ( $a_{sav}$ ):

$$V_{col} = \sum_{s_i}^{s_f} BA(a_{sav}) \quad (3)$$



**Figura 3.8.** *Cuantificación estereológica de las MNs del TB.* En **A)** se representa el bloque de ME cervical cortado en el crióstato a 60 µm de grosor. Se analizó uno de cada diez cortes (en morado), con un inicio aleatorio. **B)** De cada corte de tejido seleccionado **(1)** se tomaron imágenes de confocal a intervalos de 3 µm **(2)** en las que se cuantificaron las neuronas marcadas por los diferentes trazadores en las que era visible el núcleo. En este caso cada plano de 3 µm funcionó como un disector óptico. El cálculo del volumen parcial ocupado por las columnas en cada corte se obtuvo multiplicando las 60 µm del grosor del corte de la ME (*altura*) por el área del círculo de menor radio que encerraba todos los somas marcados con el mismo trazador en el corte **(3, círculo rojo)**.

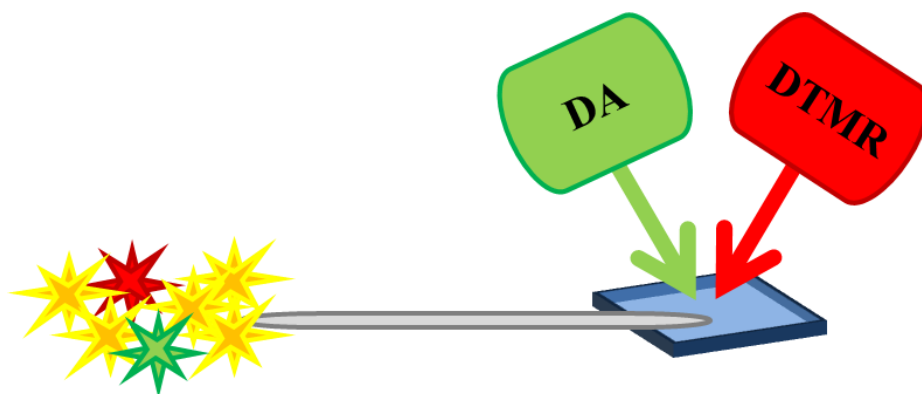
### 3.2.2. Comprobaciones relacionadas con los experimentos 1 y 2

Realizamos una serie de comprobaciones con respecto a la naturaleza de los trazadores y la técnica de marcaje seleccionada, empleando la técnica de cuantificación simple en cortes transversales de 60 µm, visualizados con luz transmitida y fluorescencia.

#### *a) Marcaje simultáneo de dos trazadores:*

Se utilizaron todos los fascículos del TB de ambas extremidades de 2 animales, un total de 12 fascículos, para comprobar la posibilidad de marcar las MNs

simultáneamente con dos trazadores y conocer su apariencia al microscopio. Se aplicó en cada nervio cortado una solución formada por la mezcla de dos trazadores al 50 % en volumen, realizando todas las combinaciones posibles entre los distintos trazadores empleados (Fig. 3.9). El objetivo de este trabajo fue confirmar que la ausencia de neuronas doblemente marcadas en los resultados de los experimentos 1 y 2 no se debió a que los trazadores fueran mutuamente excluyentes.



**Figura 3.9.** *Marcaje simultáneo con dos trazadores.* Se realizaron todas las combinaciones posibles de dos trazadores distintos, aplicando el mismo volumen de cada uno en el extremo del nervio cortado. Se esperaba encontrar muy pocas neuronas marcadas por uno sólo de los trazadores (representadas en verde y rojo), y la mayoría marcadas por los dos simultáneamente (representadas en amarillo).

*b) Intercambio de trazadores:*

Dada la gran diferencia en el número de MNs marcadas para los fascículos largo y lateral, fue importante confirmar que no había errores relacionados con la eficacia y especificidad del trazador utilizado en cada caso. En el experimento 1 se emplearon DTMR y DA, dos dextranos conjugados con diferente composición para marcar las MNs de los fascículos largo y lateral, respectivamente. En 2 animales se volvieron a trazar las MNs de dichos fascículos bilateralmente, pero intercambiando los trazadores.

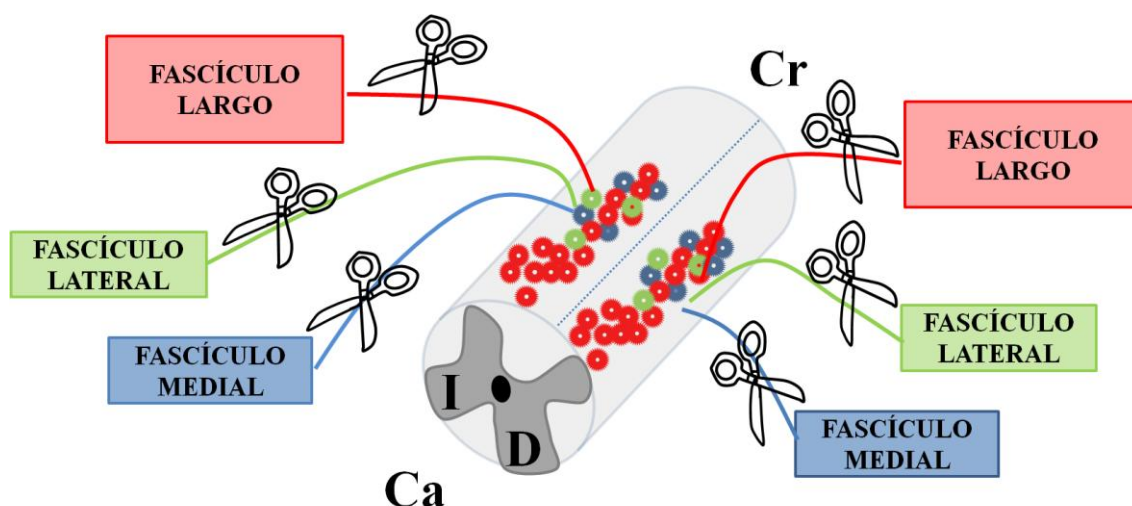
*c) Inyección intramuscular de AB:*

El número mucho menor de MNs encontradas para los fascículos lateral y medial nos obligó también a buscar posibles ramas no identificadas que proporcionaran inervación extra a estos fascículos. En un grupo de 5 animales se inyectó AB

directamente en los fascículos lateral y medial de extremidades diferentes, utilizando volúmenes proporcionales a sus pesos (5  $\mu$ l y 3  $\mu$ l, respectivamente).

*d) Comprobación de asimetrías anatómicas entre el lado derecho e izquierdo.*

Con la finalidad de descartar la existencia de asimetrías anatómicas entre las MNs del lado derecho e izquierdo, en un grupo de 4 animales se aplicaron los trazadores DTMR, FB, y HRP en las ramas de los nervios de los fascículos largo, medial y lateral, respectivamente, en ambas extremidades (Fig. 3.10).



**Figura 3.10.** Comprobación de las asimetrías entre los dos lados. Las MNs del TB fueron marcadas retrógradamente por axotomía del nervio utilizando los mismos trazadores en las dos extremidades: DTMR (rojo), DA (verde) y FB (azul).

### 3.2.3. Análisis estructural del TB

En un grupo de 18 animales se procedió a la extracción y procesamiento del músculo completo (n = 9) o de cada fascículo por separado (n = 9) con el fin de cuantificar su tamaño y el sus fibras, así como identificar los tipos de fibras musculares.

*a) Extracción y congelación de los fascículos y del músculo completo.*

Con los animales bajo anestesia general, piel y grasa superficial de ambos brazos fueron eliminadas y con mucho cuidado se diseco el músculo TB, separando los

tendones de unión al hueso. En algunos casos los fascículos fueron extraídos de forma independiente cortando el tendón de origen, mientras que en se extrajo el músculo completo con los fascículos unidos. Inmediatamente después de la extracción, los músculos fueron pesados, cubiertos con polvo de talco para evitar la formación de cristales de hielo dentro del tejido (Pullen 1975), y congelados sumergiéndolos directamente en nitrógeno líquido durante unos minutos. Después, el tejido se mantuvo a - 85 °C hasta su procesamiento, siendo cortado transversalmente a 20 µm de grosor en crióstato. Los animales fueron sacrificados inmediatamente después de la extracción de los músculos con una inyección intracardiaca de pentobarbital sódico.

*b) Procesamiento histoquímico para ATPasa.*

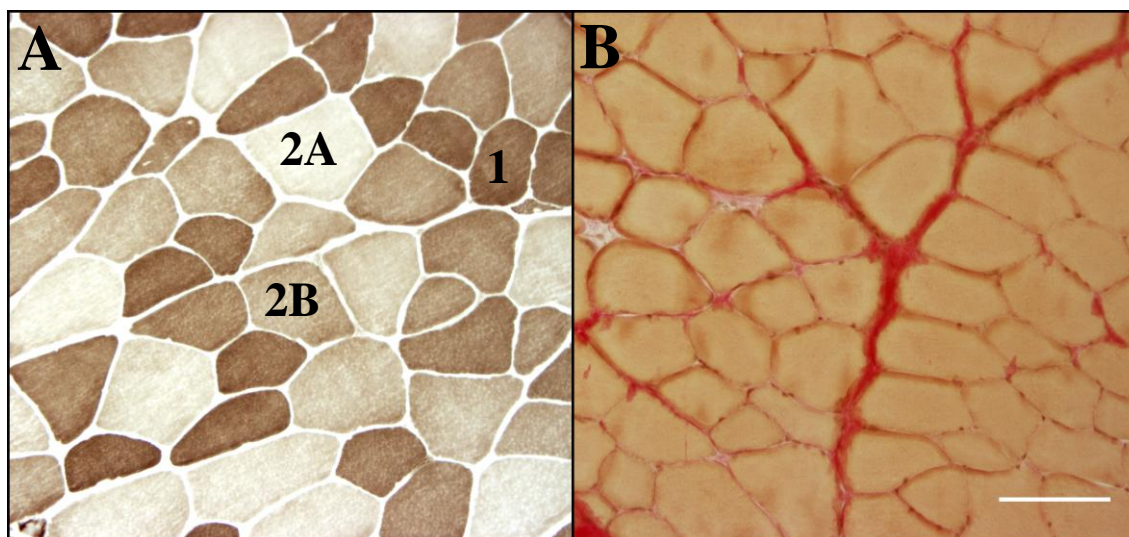
Todos los estudios realizados de la arquitectura muscular se hicieron en secciones tomadas en la mitad del vientre muscular. Secciones alternas del músculo fueron procesadas para ATPasa el mismo día que fue cortado, usando una modificación del método desarrollado por Guth y Samaha (1970). Las secciones fueron incubadas a 4 °C durante 12 minutos en una solución de tampón acetato a pH 4.6 con KCl 100 mM. Después de lavar el tejido en H<sub>2</sub>O<sub>d</sub> durante 30 segundos, se incubó durante 30 minutos a 37 °C en una solución de reacción con 3 mM de ATP, 30 mM de CaCl<sub>2</sub> y 55 mM de NaCl en tampón NaOH / glicina 50 mM. Tras incubar y lavar el tejido con H<sub>2</sub>O<sub>d</sub>, se sumergió en una solución de CaCl<sub>2</sub> al 1 % durante 3 minutos a temperatura ambiente. Se volvió a lavar con H<sub>2</sub>O<sub>d</sub> y se deshidrataron las muestras pasándolas por concentraciones crecientes de etanol, se aclararon con xileno y se montaron con DPX para su conservación y observación en el microscopio.

Con este procedimiento se produjeron tres intensidades de color en las fibras musculares (Fig. 3.11-A) que se corresponden con los tipos 1, 2A y 2B, respectivamente (Lieber 2002, Wang y Kernell 2001, Hintz y col. 1984, Green y col. 1982, Pullen 1977).

*c) Tinción histológica de Van Gieson.*

Cortes alternos de tejido muscular fueron procesados histológicamente siguiendo un protocolo modificado del propuesto por Van Gieson en 1889 (Fig. 3.11-B).

1. *Hidratación y lavado* de las muestras: 3 x 10 segundos con agua corriente ( $H_2O_c$ ).
2. *Tinción con hematoxilina de Weigert* durante 12 minutos.
3. *Lavado* de las muestras: 3 x 10 segundos con  $H_2O_c$ .
4. *Tinción con la solución de Van Gieson* durante 5 minutos.
5. *Deshidratación* del tejido: 30 segundos en etanol al 70 %, 1 minuto en etanol al 95 % y 3 minutos en etanol al 100 % (2x).
6. *Aclarado* del tejido: 5 minutos en xileno al 100 % (2x).
7. *Montaje* con DPX para su conservación y análisis.



**Figura 3.11.** A) Imagen de un corte transversal de músculo procesado para ATPasa con preincubación a pH 4.6, en el que se muestran las tonalidades de color y los tipos de fibras correspondientes. B) Corte transversal de tejido muscular teñido con la tinción de Van Gieson. La escala representa 100  $\mu$ m.

*d) Clasificación, cuantificación y medición de las fibras musculares.*

Las secciones procesadas con la tinción de Van Gieson fueron empleadas para realizar las medidas del área transversal del músculo completo ó por fascículos, así como para contar las fibras musculares en cada fascículo. El tejido procesado para ATPasa permitió clasificar las fibras musculares en tipo 1, 2A o 2B, y también medir el área transversal para cada tipo de fibra. Las cuantificaciones se llevaron a cabo en un 10 % del área transversal del músculo que fue el resultado de la suma de 10 cuadrados con

una superficie de 500  $\mu\text{m}$  x 500  $\mu\text{m}$  de lado, que fueron sistemáticamente seleccionadas de una cuadrícula colocada sobre cada sección. Para calcular el número total de fibras se extrapoló el número de fibras contadas en los 2.5  $\text{mm}^2$  (área de las 10 cuadrículas) al área total del músculo. Las medidas del tipo de fibra, tamaño y número también se hicieron a partir de las fibras contenidas en las cuadrículas.

### **3.3 MODIFICACIONES EN LOS CIRCUITOS NEURONALES DEL TB TRAS UNA LESIÓN MEDULAR**

#### **3.3.1 Supervivencia de las MNs del TB tras hemisección medular en C6**

Una vez descritas la localización exacta y las características del núcleo motor del TB, estudiamos los posibles cambios estructurales inducidos por su desinervación, realizando una hemisección medular derecha en C6. Se establecieron dos grupos de lesión con diferentes periodos de evolución y sus respectivos controles.

##### *a) Grupos de animales con lesión:*

Grupo A: formado por 8 ratas con una evolución de 6 meses tras la lesión. Se marcaron bilateralmente las MNs que inervan el TB utilizando DTMR, FB y HRP para los fascículos largo, medial y lateral, respectivamente, en ambas extremidades (Fig. 3.12-A). La región medular comprendida entre C5 y T1 se subdividió en 2 bloques que contenían los segmentos C5 - C7 y C8 - T1, respectivamente. Los bloques fueron cortados transversalmente a 60  $\mu\text{m}$ . En cada uno de ellos se realizó una pequeña incisión en el borde dorsal izquierdo para facilitar su identificación después del corte.

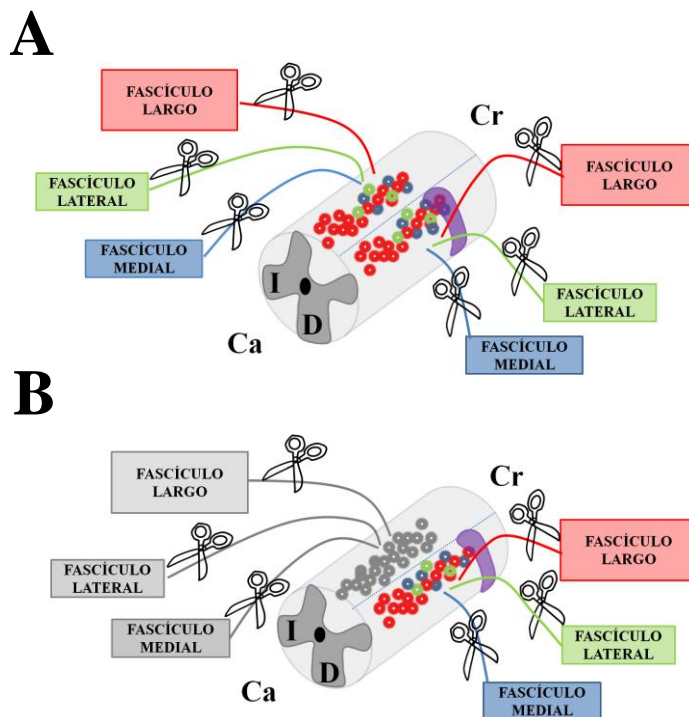
Grupo B: formado por 9 ratas con 6 semanas de evolución postlesión. Las MNs del TB fueron marcadas bilateralmente. En la extremidad derecha se aplicaron los trazadores DTMR, FB y DA para marcar las MNs de los fascículos largo, medial y lateral, respectivamente; mientras que en la extremidad izquierda se realizó un marcaje único con HRP de todas las MNs del TB (Fig. 3.12-B). El tejido medular comprendido entre C5 y T1 fue cortado horizontalmente a 60  $\mu\text{m}$ , el inicio de cada segmento se señaló



con un pinchazo de aguja hipodérmica y en el borde dorsal izquierdo del extremo craneal del bloque se realizó una incisión para orientación los cortes.

*b) Grupos de animales control:*

Se establecieron sendos grupos de animales control para los grupos con lesión, procesados simultáneamente y de forma similar. En el *grupo A* se estableció un grupo control formado por 7 animales sanos, mientras que los animales control para el *grupo B* ( $n = 8$ ) corresponden al grupo de animales descritos en el experimento 1.



**Figura 3.12** Trazadores utilizados en los grupos de lesión A y B.

**A)** En el grupo A se empleó la misma combinación de trazadores en ambas extremidades: DTMR (rojo), DA (verde) y FB (azul).

**B)** En el grupo B se utilizó DTMR (rojo), DA (verde) y FB (azul) en la extremidad derecha, mientras que en la izquierda se empleó HRP (gris) como único trazador para todas las MNs. La región del lado derecho de la médula donde se realizó la hemisección está marcada en morado. Cr = craneal; Ca = caudal.

*c) Procesamiento histológico.*

En el experimento A, una vez cuantificadas las neuronas fluorescentes, se procesó 1 de cada 4 cortes para H-E con el fin de comprobar la localización y extensión de la lesión inducida en los animales. Además, en todos los animales del grupo A, tanto en los controles como en los lesionados, se extrajo el TB de ambas extremidades y se pesó antes de sacrificar al animal, siguiendo el protocolo del apartado 3 a.

*d) Cuantificación*

Se comprobó la localización y extensión de la zona de lesión. En los dos grupos se contaron los perfiles de MNs por el método simple (apartado 3.2) y se compararon las diferencias en el número de MNs marcadas para todo el músculo y para cada uno de los fascículos. También entre las extremidades ipsilaterales y contralaterales a la lesión.

**3.3.2 Cambios sinápticos en los segmentos cervicales tras hemisección en C6**

Intentamos obtener una idea general de la reestructuración de las conexiones sinápticas en la región adyacente a la lesión estudiando la inmunorreactividad para sinaptofisina, una glicoproteína presente en la membrana de las vesículas sinápticas (Floor y Leeman, 1987) y que constituye un buen indicador del número de sinapsis y su modificación en diferentes regiones del SNC, incluida la médula espinal (Nacimiento y col. 1995; Tiraihi y Rezaie 2004). Nacimiento y col. (1995) utilizaron inmunohistoquímica para sinaptofisina y microscopía electrónica de transmisión para investigar los cambios sinápticos tras una hemisección medular torácica en la rata, encontrando una desinervación transitoria de las MNs de la médula lumbar con pérdida parcial de las sinapsis entre los 3 y 21 días postlesión en los segmentos caudales cercanos a la hemisección, que se recuperó progresivamente entre los 42 y 90 días postlesión. Teniendo en cuenta estos datos, estudiamos la sinaptofisina en 3 grupos de animales: un grupo sano ( $n = 12$ ) y dos grupos de animales lesionados con 1 mes ( $n = 12$ ) y 3 meses ( $n = 12$ ) de evolución. El lado izquierdo de la médula de cada animal sirvió como su propio control, permitiendo una comparación más fidedigna de las mediciones.

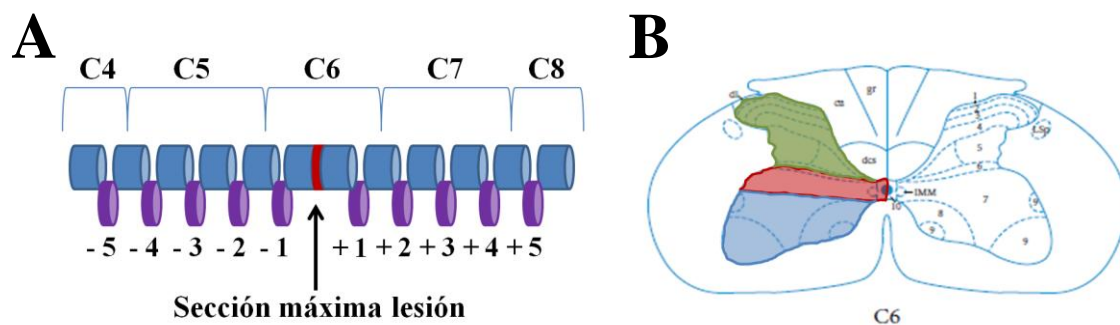
*a) Procesamiento histológico.*

Se extrajo la región medular de C4 a C8 y se hizo la marca de orientación en el borde dorsal izquierdo del bloque. El tejido fue cortado transversalmente a 30  $\mu$ m de grosor y recogido en PBS 0.1 M hasta su posterior procesamiento. Tomando como origen (coordenada 0) la zona de lesión (o la mitad del segmento C6 en el grupo control), se recogieron para estudio cortes correlativos cada milímetro de distancia

llegando hasta 5 mm craneales y caudales (Fig. 3.13-A). En cada coordenada se tomaron 2 cortes seguidos; uno se procesó para H-E y el otro para sinaptofisina.

*b) Cuantificación y análisis*

En estas muestras se comparó la reactividad para sinaptofisina en toda el área trasversal de la sustancia gris. Para conseguirlo se visualizaron los cortes de médula espinal en un microscopio video time lapse (Leica DMI 6000 B) equipado con una lámpara de fluorescencia y un cubo de fluorescencia Tx2. Las cuantificaciones de la intensidad de marcaje se llevaron a cabo en imágenes (6959 x 5199 píxeles) compuestas de la ME completa a partir de fotografías de diferentes zonas con un objetivo de 10 aumentos, capturadas con una cámara Leica DFC 350 FX y convertidas a superimagen con el programa Leica LAS AF Lite. Posteriormente se analizaron las regiones de sustancia gris positivas para sinaptofisina con el programa ImageJ, distinguiendo entre el lado ipsilateral (derecho) y contralateral (izquierdo) a la lesión. Se consideraron 4 zonas de cada lado de sustancia gris de la ME: la hemimédula completa, la región dorsal, la intermedia y la ventral (Fig. 3.13-B).



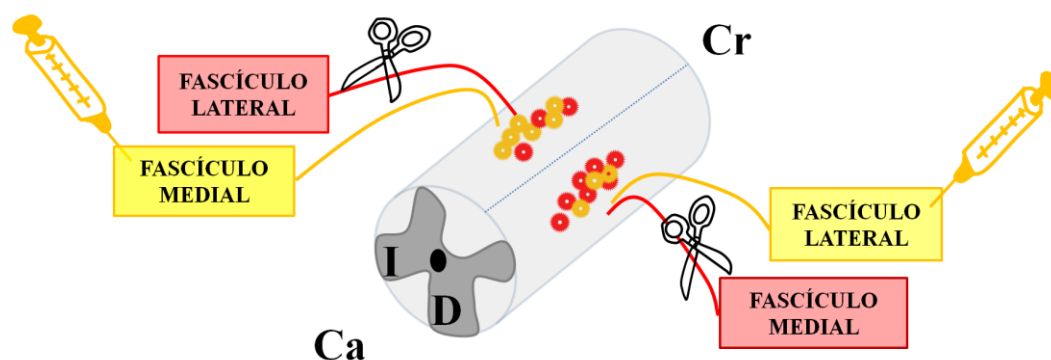
**Figura 3.13.** Estudio de los cambios sinápticos generales tras hemisección en C6. **A)** Sistema utilizado para la recogida del tejido analizado. Desde la sección con máxima lesión se recogieron muestras cada milímetro en el eje longitudinal hasta 5 mm en sentido craneal (signo negativo) y caudal (signo positivo). En la figura se correlaciona la distancia desde la lesión con los segmentos medulares correspondientes. **B)** Regiones en las que se dividió la sustancia gris para el análisis de la reactividad para sinaptofisina: dorsal (verde), intermedio (azul) y ventral (rojo). La correspondencia con las láminas se estableció con base en Paxinos y Watson, 2005.

Asumimos que la ME es simétrica, siendo cada hemimédula idéntica a la otra, y que por tanto los cambios detectados son consecuencia directa de la lesión. Todas las

cuantificaciones que se presentan han tomado como referencia los valores obtenidos en el lado sano (izquierdo), calculando el porcentaje que aumentan o disminuyen los valores del lado con lesión. Los parámetros cuantificados fueron el *área* positiva para sinaptofisina y su *intensidad* de fluorescencia. En lo referente al segundo parámetro, se analizó el *valor medio* y la *densidad integrada*. La media se calculó a partir de la suma de los valores de intensidad de todos los píxeles de la selección. La densidad integrada es el producto obtenido de multiplicar la intensidad media por el área seleccionada.

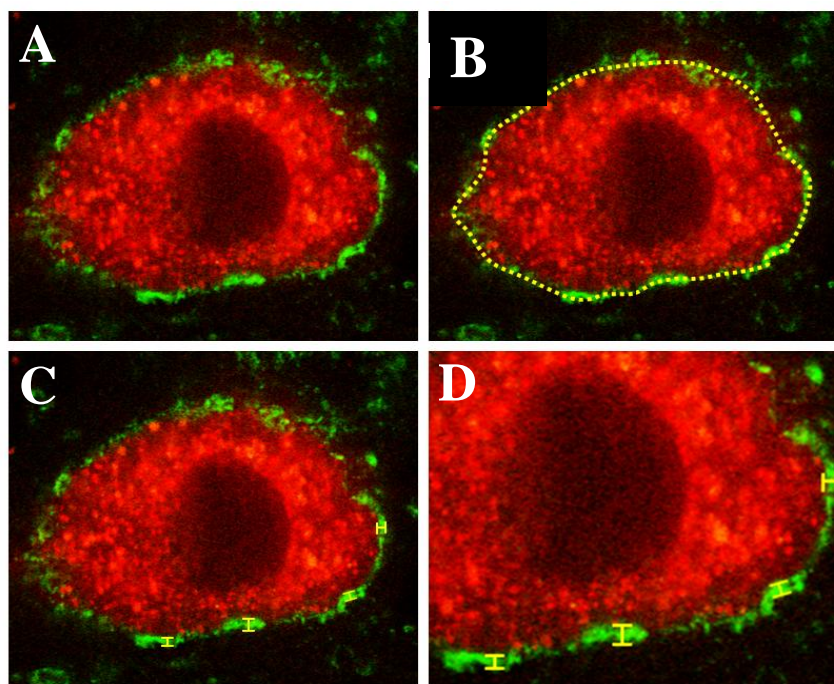
### 3.4 EFECTO DE LA AXOTOMÍA DE LAS MNs SOBRE LAS AFERENCIAS SINÁPTICAS.

El trazado retrógrado por axotomía produce un marcaje más completo de las MNs espinales que el obtenido con las inyecciones intramusculares (Richmond y col. 1994; Collazos-Castro y col. 2005) y evita la difusión del trazador y el marcaje inespecífico, pero lesiona las neuronas y podría inducir cambios tempranos en las sinapsis aferentes. Decidimos estudiar si los 3 días que dejamos vivir a los animales después del trazado por axotomía eran suficientes para alterar las sinapsis sobre las MNs, ya que de lo contrario podríamos aprovechar la versatilidad del trazado retrógrado múltiple mediante axotomía. En un grupo de 7 ratas sin lesión medular medimos la intensidad de fluorescencia para sinaptofisina sobre las MNs que inervan los fascículos lateral y medial del TB. En la extremidad derecha se marcaron las MNs del fascículo lateral por inyección intramuscular de AB (5  $\mu$ l) y las MNs del medial mediante aplicación de DTMR por axotomía. En la extremidad izquierda se invirtieron las técnicas de marcaje (Fig. 3.14), y también se redujo la cantidad de AB a 3  $\mu$ l por el menor peso del músculo. Se analizaron las MNs desde C6 hasta C8 en cortes horizontales de 60  $\mu$ m.



**Figura 3.14.** Comparativa de los cambios sinápticos tras marcaje retrógrado con DTMR por axotomía versus inyección intramuscular de AB (amarillo). Cr = craneal, Ca = caudal.

Todas las cuantificaciones se llevaron a cabo en imágenes de 1024 x 1024 píxeles, captadas con un objetivo de inmersión de 63 aumentos en un microscopio confocal (Leica TCS SP5. Alemania). Se tomaron imágenes consecutivas a intervalos de 1  $\mu\text{m}$  desde que aparecía marcaje de sinaptofisina hasta que desaparecía. En todas las imágenes se midió la intensidad media de fluorescencia sobre una línea dibujada en la zona positiva para sinaptofisina alrededor del soma de la neurona (Fig. 3.15 A-B). Para las mediciones se utilizó el programa Analysis. Además, se cuantificó el grosor medio del halo de marcaje de sinaptofisina alrededor de la neurona (Fig. 3.15 C-D). En este caso se realizaron las medidas en 10 puntos de la superficie del soma equidistantes entre sí, y se promediaron luego las mediciones para cada célula. Se compararon los dos parámetros analizados (valor promedio de intensidad y grosor del halo de marcaje) en función de la técnica de marcaje (axotomía versus inyección intramuscular) y los dos tipos neuronales estudiados (MNs de los subnúcleos de los fascículos lateral y medial).



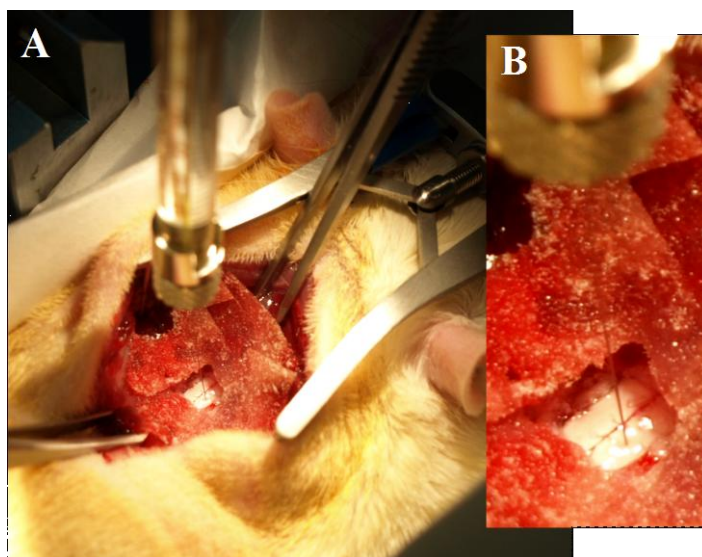
**Figura 3.18.** Medidas de la fluorescencia para sinaptofisina sobre las MNs del TB. **A)** Imagen de un perfil neuronal marcado con DTMR (rojo) y con sinaptofisina revelada con un anticuerpo secundario conjugado con Alexa Fluor 488 (verde). La línea en **(B)** indica la zona utilizada para medir la fluorescencia media para sinaptofisina alrededor del soma. **C)** Medición del grosor medio de la zona positiva para sinaptofisina. Se realizaron varias medidas sobre la superficie del soma y se calculó la media para cada muestra. **D)** Ampliación a partir de **(C)** para visualizar mejor la medición del grosor de la zona positiva para sinaptofisina. La escala representa 5  $\mu\text{m}$ .

### 3.5 MARCAJE RETRÓGRADO DE LAS NEURONAS SUPRAESPINALES Y PROPIOESPINALES QUE PROYECTAN A C7.

Inyectamos AB en el lado derecho del segmento medular C7 y estudiamos el número y distribución de las interneuronas marcadas en la médula cervical desde C1 a C5.

#### 3.5.1 Técnica de inyección intramedular.

El abordaje quirúrgico inicial es similar al descrito para realizar la hemisección cervical hasta la hemilaminectomía, que en este caso se realizó en la vértebra C6 bajo la que se encuentra el segmento medular C7. En ese momento colocamos al animal en un aparato estereotáxico e inmovilizamos el área de trabajo con dos pinzas ancladas a las apófisis espinosas de C2 y T2. Para la inyección del trazador utilizamos una jeringa Hamilton equipada con microagujas especiales (diámetro externo de 0.125 mm) para causar poco daño a la ME. La vena dorsal sirvió como referencia de la línea media de la ME en el eje y la raíz dorsal como referencia de la región central de C7 en el eje cráneo-caudal. Desde ahí nos desplazamos 0.8 mm lateralmente y 0.5 mm en dirección craneal, donde introducimos la aguja a 1 mm de profundidad en la ME, intentando posicionar la aguja en la sustancia gris ventral, y luego liberamos 0.2  $\mu$ l de AB (Fig. 3.19).



**Figura 3.19.** *Inyección intramedular de aminoestilbamidina en C7.* A) Imagen de la microaguja en el interior de la hemimédula derecha. Después de realizar la hemilaminectomía se colocó una esponja de gelatina (spongostan MS0001, Johnson & Johnson; New Jersey USA) alrededor para mantener la zona limpia. En B) se muestra una imagen ampliada de la zona de inyección.



Pasados 10 min. retiramos lentamente la aguja para evitar el reflujo del trazador y nos desplazamos 1 mm en dirección caudal y repetimos la operación. Una vez terminada la segunda inyección, se suturó en capas el tejido muscular y se aproximaron los bordes de la piel mediante una sutura intradérmica.

### **3.5.2 Identificación y cuantificación de las neuronas que proyectan a C7.**

En gato y en primates se ha descrito la existencia de un circuito cervical premotoneuronal que sirve como vía de relevo entre los tractos supraespinales y las MNs que inervan la musculatura del miembro anterior, pero estos circuitos no se han estudiado en rata. Aquí hemos querido realizar un estudio preliminar sobre la cantidad y localización de las neuronas que proyectan a C7 desde los segmentos cervicales C1 a C5, como un primer paso para identificar las posibles neuronas propioespinales que proporcionan sinapsis a las MNs del TB y a sus interneuronas intrasegmentarias. Para realizar las cuantificaciones se emplearon imágenes de 2776 x 2074 píxeles, tomadas con un objetivo de 10 aumentos en un microscopio de fluorescencia equipado con una cámara Olympus DP50. Los experimentos se realizaron en tres fases.

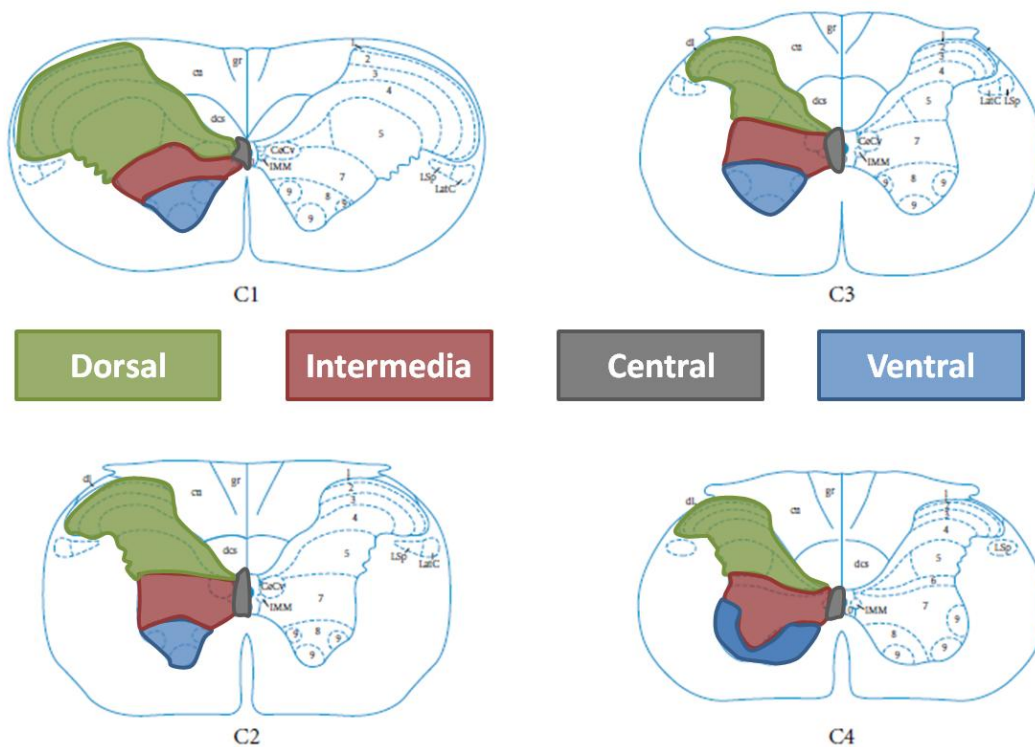
#### *a) Aproximación inicial*

Se usaron 3 animales con distintos tiempos de supervivencia (6, 24 y 72 horas) tras la inyección intramedular de AB en C7 para comprobar la velocidad de transporte del trazador y obtener el marcaje óptimo de las estructuras de interés. Se estudió la presencia de neuronas fluorescentes en la región lumbar (L2-L4), torácica (T9-T10), cervical dividida en dos bloques (C3-C6 y C7-T1) y en las estructuras encefálicas. Se tomó uno de cada 2 cortes para cuantificar y analizar la distribución de las neuronas en estas regiones. Además, se comprobó la localización de la inyección del trazador.

#### *b) Cuantificación y distribución segmentaria de las neuronas que proyectan al lado derecho de C7 desde los segmentos C1 a C4.*

Se aplicó el protocolo de trazado en un grupo de 4 animales sanos que fueron perfundidos 24 h después. Se extrajeron los segmentos medulares C1 a C8 y se

dividieron en dos bloques (C1-C4 / C5-C8), marcando siempre con una pequeña incisión el borde dorsal izquierdo para orientar posteriormente las muestras. El tejido fue cortado transversalmente a 50  $\mu\text{m}$  y se utilizó 1 de cada 2 cortes para cuantificar los perfiles de neuronas marcadas en el bloque C1-C4, mientras que del bloque C5-C8 se tomaron cortes alternos para determinar la localización y difusión de la inyección del trazador. Las cuantificaciones de los perfiles de neuronas marcadas se hicieron en función de su localización en la hemimédula ipsilateral (lado derecho) o contralateral (lado izquierdo) a la inyección del trazador, y dentro de la sustancia gris en la región dorsal (láminas 1-5), intermedia (láminas 6 y 7), ventral (láminas 8 y 9) y central (lámina 10) como se muestra en la Fig. 3.20.



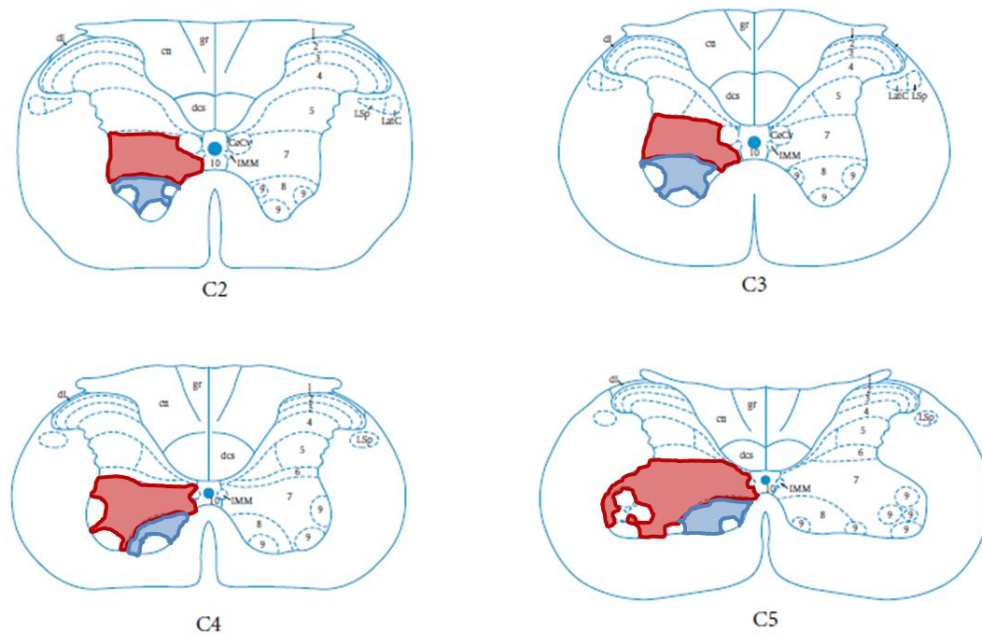
**Figura 3.20.** División de la sustancia gris de los segmentos medulares desde C1 a C4 en regiones para cuantificar las neuronas marcadas con AB. Cada hemimédula se ha dividido en 4 regiones: dorsal (verde), intermedia (roja), ventral (azul) y central (gris oscuro). La distribución de las láminas se ha tomado de Paxinos y Watson, 2005.

*c) Cuantificación de las neuronas marcadas en las láminas 7 y 8 de los segmentos C2 a C5.*

Como consecuencia de los resultados obtenidos en los dos estudios anteriores se decidió incluir un tercer grupo de 5 animales sanos, aplicando el mismo protocolo de



inyección intramedular de AB. Se extrajeron los segmentos medulares desde C2 a C8 y se dividieron en dos bloques (C2-C5 / C6-C8) que fueron cortados transversalmente a 60 µm. La cuantificación de los perfiles de neuronas marcados se hizo en 1 de cada 2 cortes tomados del bloque C2 - C5, y el segundo bloque se utilizó para conocer la localización de la inyección del trazador. En la Fig. 3.20 se muestran las regiones de la sustancia gris de la ME (láminas 7 y 8) donde se realizaron las cuantificaciones de los perfiles neuronales marcados por AB. Además, la localización de los perfiles neuronales se discriminó por segmentos y por el lado de la hemimédula en ipsilateral (lado derecho) o contralateral (lado izquierdo) a la inyección del trazador.

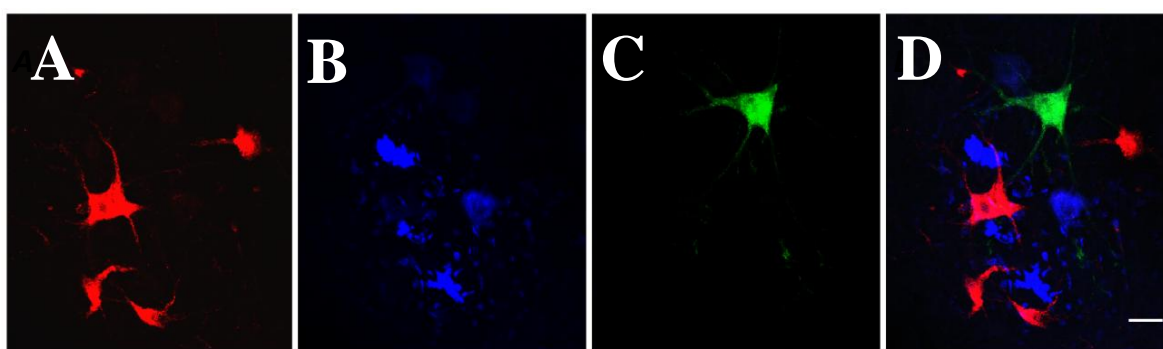


**Figura 3.20.** Identificación de las láminas 7 (azul) y 8 (rojo) en los segmentos medulares C2 a C5. La distribución de las láminas se ha tomado de Paxinos y Watson, 2005.

## *4. Resultados*

## 4.1 ANATOMÍA DEL NÚCLEO MOTOR DEL TB EN LA RATA

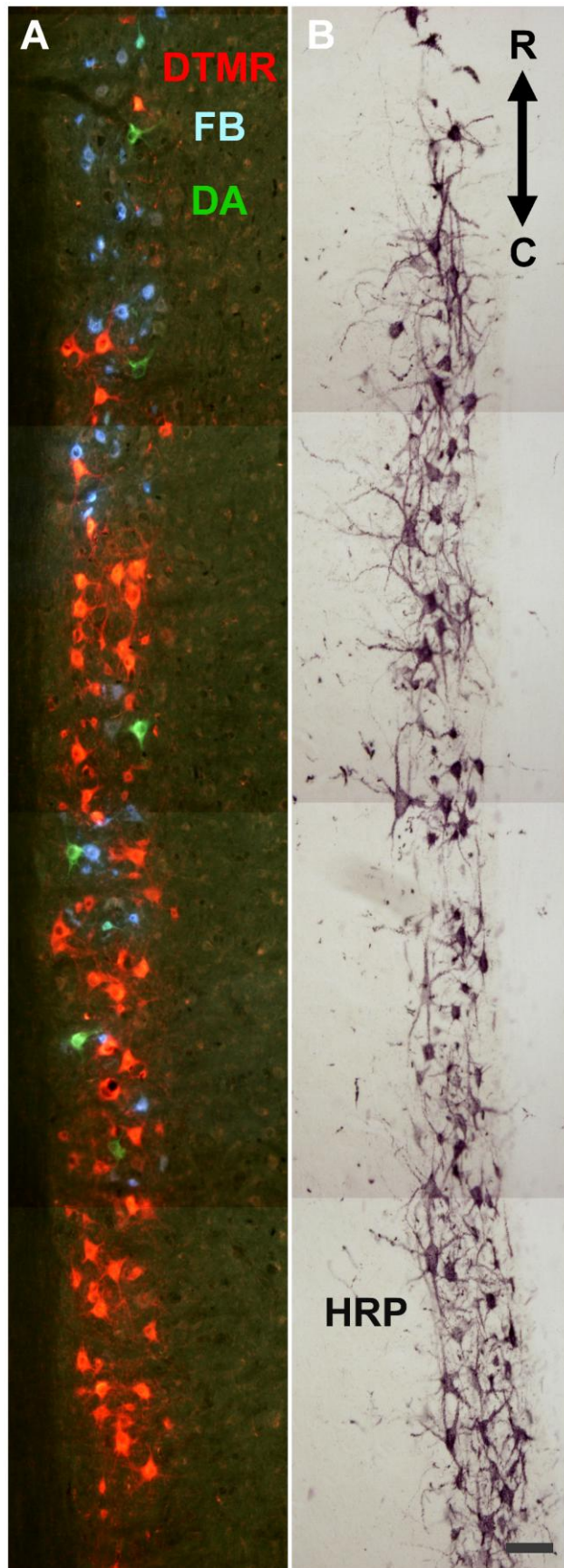
Inicialmente realizamos una descripción detallada de la innervación del TB. Utilizando un paradigma de trazado múltiple para el núcleo motor de cada uno de los fascículos del TB no se encontraron perfiles de neuronas marcadas por más de un trazador, indicando que cada fascículo está innervado por un subgrupo diferente de MNs. Los tres subtipos de neuronas se encuentran entremezclados formando una única columna localizada en la región lateral del asta ventral de la médula cervical (*Fig. 4.1*).



**Figura 4.1.** *Inervación independiente de los fascículos del TB en rata.* En las imágenes se muestran perfiles de las MNs marcadas con diferentes trazadores. **A)** MNs del fascículo largo marcadas con DTMR; **B)** MNs del fascículo medial marcadas con FB; **C)** MNs del fascículo lateral marcada con DA. **D,** imagen conjunta. La escala representa 25  $\mu$ m.

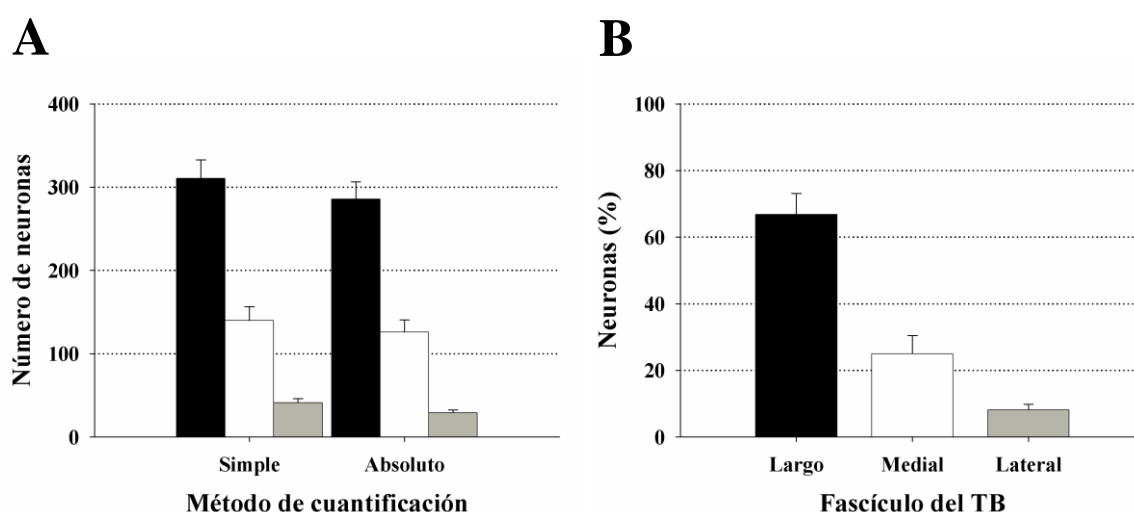
### 4.1.1 Cuantificación de las MNs que innervan cada fascículo.

En este experimento usamos DTMR, FB y DA para marcar independientemente los subnúcleos motores del TB derecho, y aplicamos HRP en todos los del izquierdo, pudiendo comparar así la efectividad global de los trazadores fluorescentes con respecto a un estándar de marcaje neural retrógrado. El procesamiento histoquímico del tejido para visualizar la HRP no afectó la señal de los fluorocromos (*Fig. 4.2*) y no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre el número total de células marcadas con HRP y con trazadores fluorescentes, lo que avaló la fiabilidad de los últimos para cuantificar los diferentes grupos de neuronas. En la *Fig. 4.3-A* se representa el número de perfiles de neuronas encontradas para cada fascículo utilizando los métodos de contar simple y absoluto.



**Figura 4.2.** *Columna de MNs que inerva el TB.* Las imágenes muestran secciones horizontales de los segmentos C6 a C8 del lado derecho (**A**) e izquierdo (**B**) de la ME de una rata adulta. Se utilizaron diferentes trazadores fluorescentes para los subnúcleos

El método de cuantificación simple sobreestimó la cantidad de MNs en un  $15.1 \pm 3.8 \%$  de media respecto al método absoluto (ANOVA de una vía,  $p < 0.001$ ; posttest de Dunn,  $p < 0.05$ ). Un dato reseñable es que la diferencia entre ambas técnicas de contar no fue homogénea para todos los fascículos, siendo el error obtenido en el fascículo lateral significativamente mayor que para el resto de fascículos. De esta manera, el porcentaje de MNs sobreestimadas fue de  $29.6 \pm 5.3 \%$ ,  $8.0 \pm 3.6 \%$  y  $10.0 \pm 3.1 \%$  para los subnúcleos de los fascículos lateral, largo y medial, respectivamente (ANOVA de una vía,  $p < 0.001$ ; posttest de Holm-sidak,  $p < 0.05$ ). La diferencia puede explicarse por el hecho de que las MNs del fascículo lateral tienen un tamaño medio de soma mayor que el resto, como lo indican los resultados del *experimento 3*. El mayor tamaño incrementa la probabilidad de que una misma neurona aparezca en más de una sección contigua del tejido, y sea entonces contada más de una vez por el método simple. Los resultados del *método de cuantificación absoluto* (Fig. 3.3-A) mostraron que el núcleo motor del TB de la rata está compuesto por un total de  $427.2 \pm 15.9$  MNs distribuidas en tres subnúcleos de tamaño claramente diferente (ANOVA de una vía,  $p < 0.001$ , posttest de Dunn,  $p < 0.05$ ), correspondiendo  $298.0 \pm 10.8$  MNs al fascículo largo,  $121.1 \pm 12.9$  MNs al medial y  $32.2 \pm 10.3$  MNs al lateral. En la Fig. 4.3-B se muestra la distribución porcentual de neuronas para cada subnúcleo motor del TB.



**Figura 4.3.** Cuantificaciones del experimento 1. **A)** Número de neuronas que inerva cada fascículo del TB, obtenido por las técnicas de cuantificación simple y absoluta. **B)** Distribución en porcentaje de las neuronas cuantificadas para cada subnúcleo del TB por el método absoluto. Los datos se representan como la media  $\pm$  el error estándar.

#### 4.1.2 Distribución segmentaria de las MNs.

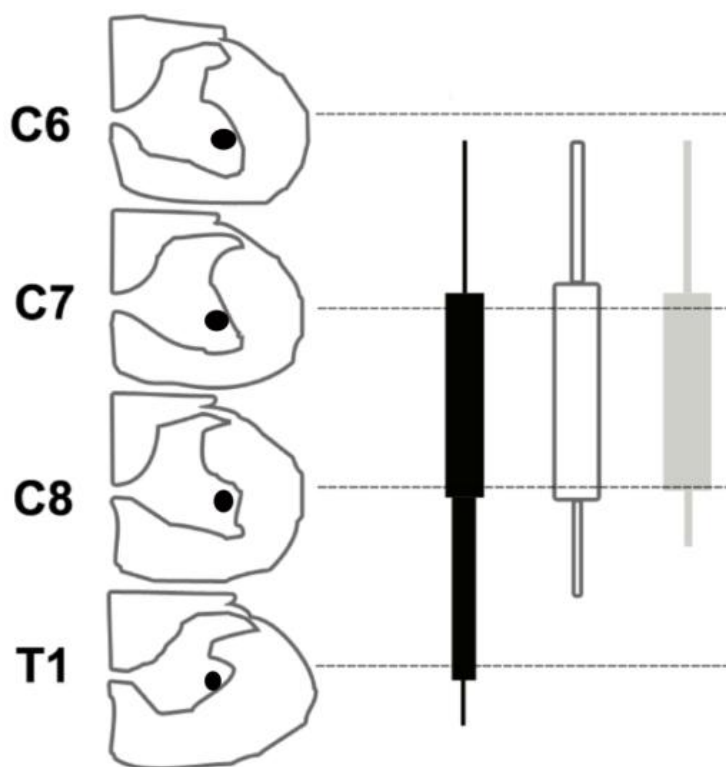
En este experimento también utilizamos trazadores diferentes para el marcaje retrógrado de las neuronas del lado derecho e izquierdo del animal. Además, cada segmento medular fue procesado independientemente y se realizaron cortes transversales. Las MNs se cuantificaron por el método simple y no se obtuvieron diferencias en comparación con los resultados del experimento 1, en el cual el tejido se procesó en cortes horizontales y se utilizaron otros trazadores los mismos grupos de neuronas. Esto confirmó que las diferencias de tamaño de los subnúcleos de MNs para cada fascículo eran reales y no se debían a la efectividad de los trazadores empleados ni al plano de sección del tejido. El estudio detallado de la distribución de las MNs en las muestras de tejido cortado transversalmente nos permitió obtener una idea completa de la localización de cada subnúcleo en la médula cervical (*Tabla 4.1*).

Fascículo	Segmentos medulares				
	C6	C7	C8	T1	Completo
<b>Largo</b>	12 ± 5 (4 ± 1%)	142 ± 16 (53 ± 5%)	106 ± 16 (39 ± 5%)	11 ± 3 (4 ± 1%)	271 ± 19 (68.60 ± 5.11%)
<b>Medial</b>	18 ± 2 (12 ± 2%)	81 ± 18 (74 ± 4%)	10 ± 5 (14 ± 6%)	0 (0 %)	127 ± 15 (27.25 ± 4.17%)
<b>Lateral</b>	4 ± 1 (12 ± 3%)	26 ± 6 (77 ± 6%)	4 ± 1 (11 ± 4%)	0 (0 %)	34 ± 7 (4.13 ± 1%)
<b>Completo</b>	31 ± 4 (7.7 ± 0.6%)	250 ± 57 (60.4 ± 4.7%)	120 ± 48 (28.9 ± 4.2%)	13 ± 7 (2.9 ± 0.9%)	431 ± 11

**Tabla 4.1.** Distribución segmentaria de las MNs que inervan cada fascículo del TB. Datos obtenidos por la técnica de contar simple en cortes transversales de la ME.

No se observaron diferencias obvias en la localización y distribución de cada subnúcleo en los ejes dorso-ventral y medio-lateral de la médula espinal, pero si en su extensión y distribución en el eje longitudinal (*Fig. 3.2*). Globalmente, la columna se extiende desde el segmento medular C6 hasta el inicio de T1 con una longitud total de  $7.3 \pm 0.5$  mm, aunque en la porción más caudal de la columna (T1) sólo encontramos

neuronas que inervan el fascículo largo. La subcolumna de MNs del fascículo largo tiene una longitud media de  $7.2 \pm 0.2$  mm que es claramente mayor a las de los otros dos fascículos (ANOVA de una vía,  $p < 0.001$ ; posttest de Holm-sidak,  $p < 0.05$ ). El subnúcleo motor para el *fascículo medial* se extiende  $4.2 \pm 0.4$  mm desde C6 hasta C8. Por último, las neuronas del *fascículo lateral* son las menos abundantes y se distribuyen de forma aislada e irregular a lo largo de  $3.8 \pm 0.5$  mm. Como se muestra en la Tabla 3.1, las neuronas que componen la columna no se distribuyen homogéneamente. Más de la mitad del total ( $60.78 \pm 2.7$  %) se localizan en C7, y si sumamos las neuronas que aparecen en los segmentos C7 y C8 alcanzamos casi el 90 % del total. Si dividimos la columna completa en una región rostral formada por los segmentos C6 y C7 y otra caudal con los segmentos C8 y T1, encontraríamos que  $\sim 90\%$  de las neuronas que inervan los fascículos medial y lateral se localizan en la porción rostral de la columna, mientras que las del fascículo largo se distribuyen aproximadamente a medias en las dos porciones. Así, podemos decir que la parte rostral de la columna inerva todos los fascículos y la parte caudal inerva principalmente el fascículo largo (Fig. 4.4).

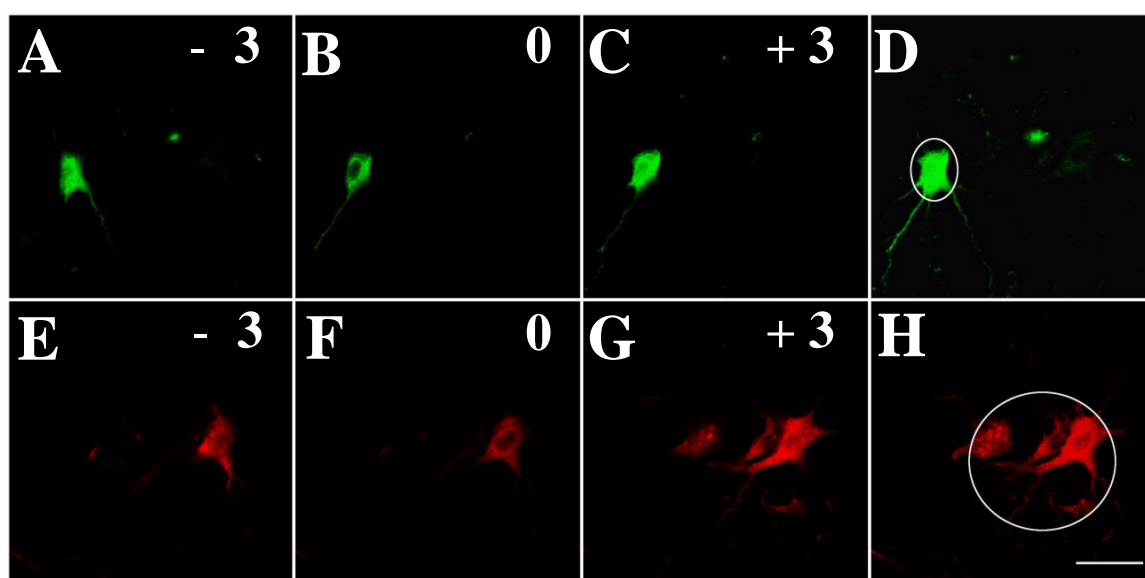


**Figura 4.4.** Esquema de la distribución de las MNs del TB.

En el lado izquierdo se representa con un círculo negro la localización de la columna en la región lateral del asta ventral de la sustancia gris entre C6 y T1. De forma paralela en el lado derecho se muestra la extensión longitudinal de las columnas de MNs que inervan el fascículo largo (negro), medial (blanco) y lateral (gris). Las diferencias en grosor de las barras reflejan los porcentajes de distribución de las MNs en los segmentos que ocupa, pero no la cantidad absoluta de neuronas en cada subnúcleo.



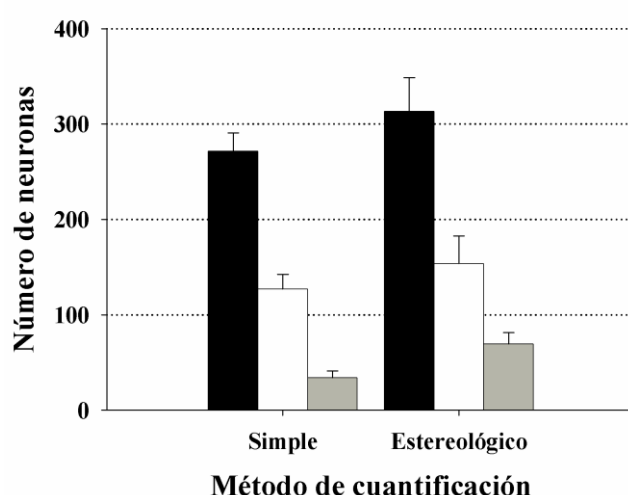
De acuerdo con los resultados del experimento 1, el número de MNs contado en el experimento 2 podría estar sobreestimado en cierta proporción. Aunque esto es irrelevante para el análisis de la distribución relativa de los subgrupos de MNs, intentamos mejorar estas cuantificaciones. Puesto que aquí se obtuvieron cortes transversales de los segmentos cervicales, su número (más de 100 secciones en cada caso) hizo ineficiente el método de contar absoluto que empleamos en el experimento 1. Por consiguiente, decidimos comparar el método de contar simple con un procedimiento estereológico (una variante del fraccionador óptico, ver Material y Métodos y Fig. 4.5) para obtener un número neuronal fiable y con menos error.



**Figura 4.5.** *Método de cuantificación estereológica.* En el panel se muestran imágenes confocales de perfiles de neuronas del TB en tres niveles de profundidad con un intervalo de 3  $\mu\text{m}$ . Las neuronas del fascículo lateral (A – D) se marcaron retrógradamente con DA, y las del fascículo largo (E – H) con DTMR. El núcleo de la neurona (plano ecuatorial en B y F) se utilizó como unidad de medida estereológica (coordenada 0), mientras que las imágenes precedentes (A, E) y posteriores (D, F) se tomaron a -3 y +3  $\mu\text{m}$ , respectivamente. Estas secuencias demuestran que el intervalo de 3  $\mu\text{m}$  es adecuado para la correcta identificación del núcleo. Las proyecciones completas de todos los disectores se muestran en D y H para ilustrar el método de estimación del área transversal de la columna (círculo blanco en D y H). Obsérvese que D contiene una única neurona del fascículo lateral, lo que lleva a un área transversal pequeña de su columna en esta sección. El área transversal del subnúcleo del fascículo largo (H) es mayor porque aparece otro soma en la sección. La escala representa 50  $\mu\text{m}$ .



El volumen de referencia usado en el método estereológico se calculó directamente para cada columna de MNs, para lo cual fue determinante obtener una medida precisa del área transversal de la columna. Como se observa en la Fig. 4.5, el área transversal de la columna varía dependiendo del número de neuronas presentes en la sección bajo estudio. Aun así, el método estereológico produjo una estimación razonable del número de neuronas (Fig. 4.6), proporcionando datos similares a los obtenidos por el método simple para los perfiles de MNs de los fascículos largo y medial. Sin embargo, el método estereológico sobrestimó notablemente las neuronas del fascículo lateral (ANOVA de una vía,  $p < 0.001$ , postest de Dunn,  $p < 0.05$ ). Es muy probable que esto se debiera al pequeño número de neuronas que componen este subnúcleo, junto con su distribución irregular a lo largo de la columna.

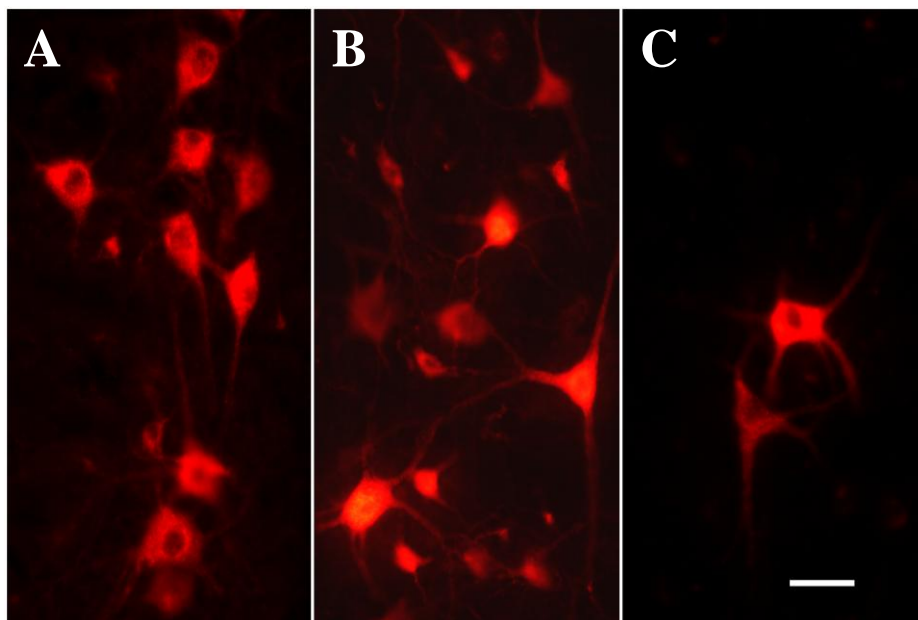


**Figura 4.6.** Comparativa de los métodos de cuantificación simple y estereológico. Se representa el número de perfiles de neuronas marcadas que inerva el fascículo largo (negro), medial (blanco) y lateral (gris). Los datos se

#### 4.1.3 Medición de los perfiles neuronales de los subnúcleos del TB.

Las MNs de los fascículos lateral y medial fueron marcadas retrógradamente con el mismo trazador (DTMR), pero en diferente extremidad de un mismo animal. Al realizar el marcaje de ambos grupos con el mismo trazador y bajo las mismas condiciones de procesamiento hemos podido comparar directamente el área de los contornos neuronales de cada subnúcleo. Para el fascículo lateral el valor medio fue  $815.5 \pm 42.9 \mu\text{m}^2$ , un 15 % mayor que el obtenido para el medial ( $706.4 \pm 27.8 \mu\text{m}^2$ ; t-test,  $p < 0.05$ ; Fig. 4.7). Partiendo del supuesto de que las neuronas tipo gamma son aquellas cuyo soma presenta un área inferior a  $500 \mu\text{m}^2$  (Swett y col. 1986; Ishihara y col. 2006; Roy y col. 2007) estimamos el porcentaje de este tipo de neuronas en los dos

subnúcleos motores, obteniendo valores muy cercanos al 22 % en ambos casos. En animales diferentes se midió el área de los perfiles del subnúcleo del fascículo largo marcadas con el mismo trazador, obteniéndose un valor de  $709.27 \pm 57.93 \mu\text{m}^2$  y una proporción de neuronas tipo gamma similar al de los otros dos fascículos.



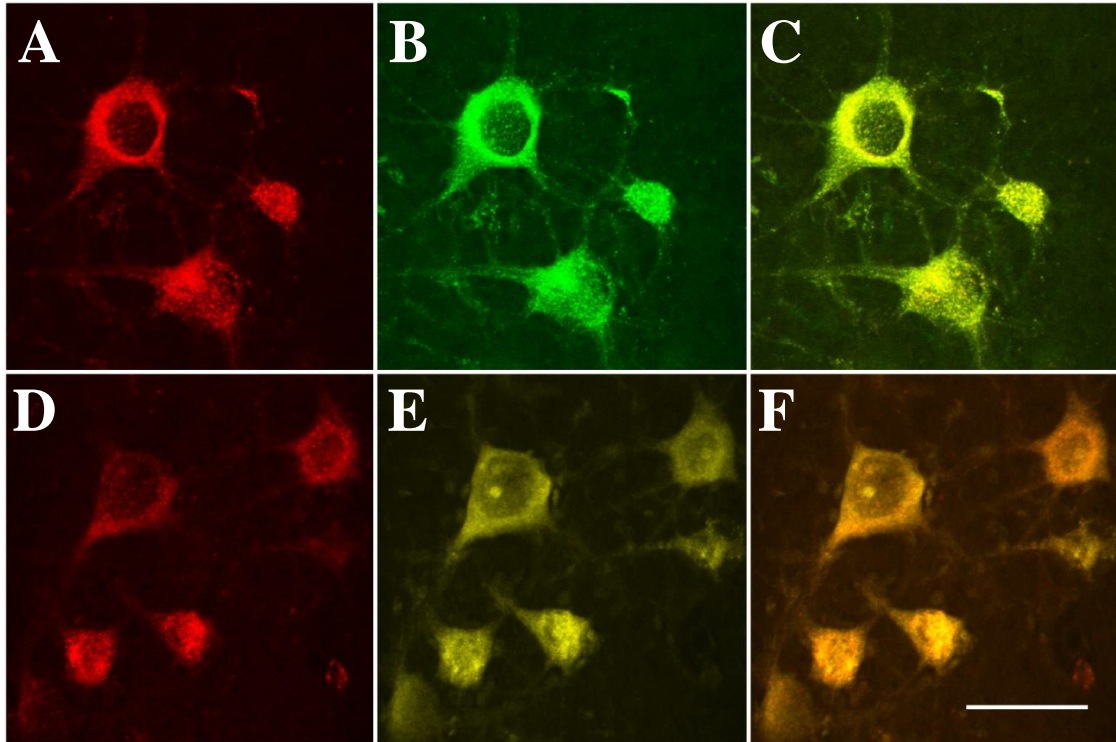
**Figura 4.7.** *MNs de los subnúcleos del TB marcadas con DTMR. A)* MNs del fascículo largo, *B)* MNs del fascículo medial, *C)* MNs del fascículo lateral. Para la medición del área del soma se dibujó el contorno de las neuronas con el núcleo visible. La escala

## 4.2 ADECUACIÓN DE LOS TRAZADORES AL OBJETO DE ESTUDIO.

### 4.2.1 Marcaje simultáneo con dos trazadores

En este experimento, aplicamos en cada nervio una solución compuesta por la mezcla 1:1 de dos trazadores. Se realizaron todas las combinaciones posibles de los trazadores empleados en los estudios descritos anteriormente, y siempre se detectó doble marcaje en las neuronas correspondientes. En la Fig. 4.8 se muestran solamente dos de las combinaciones realizadas, pero el mismo fenómeno se observó con las otras, incluyendo aquellas en las que se combinó un trazador fluorescente con la HRP. Estos resultados confirmaron que los trazadores seleccionados no se excluyen mutuamente y por tanto, la

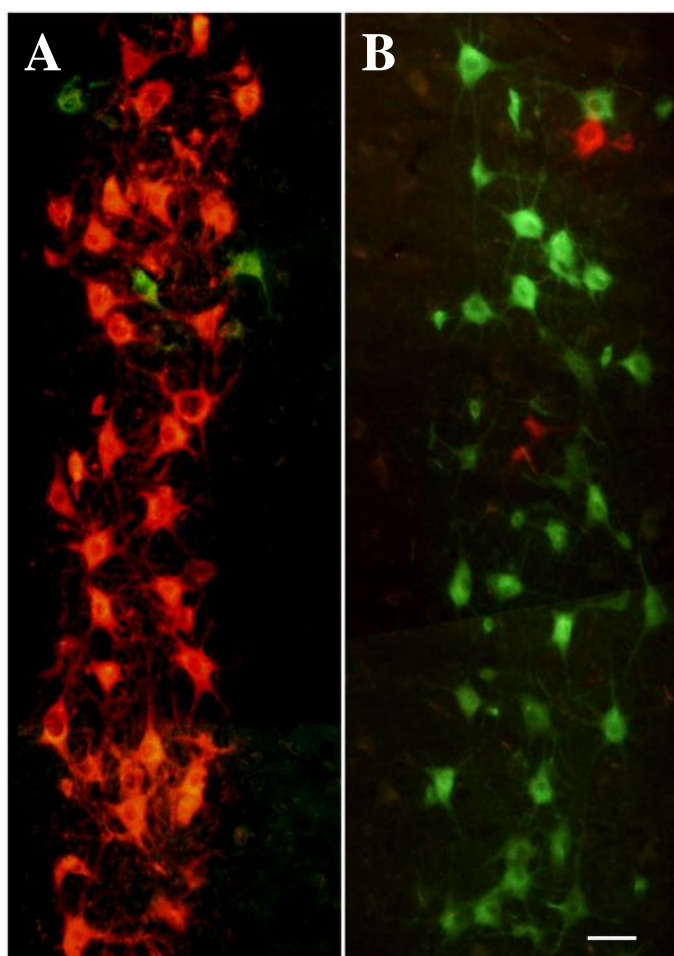
ausencia de neuronas doblemente marcadas en los experimentos 1 y 2 refleja la anatomía real y no es un artefacto debido a los trazadores neuronales.



**Figura 4.8.** *Neuronas marcadas por dos trazadores.* Panel con imágenes confocales de perfiles de neuronas marcadas con dos trazadores retrógrados fluorescentes mezclados: DTMR y DA (**A** – **C**); DTMR y AB (**D** – **F**). En la primera y segunda columna se muestran imágenes obtenidas usando las longitudes de ondas específicas de excitación y emisión para cada trazador; DTMR (**A**, **D**), DA (**B**) y AB (**E**). En la tercera columna aparece la combinación de las dos anteriores: DTMR + DA (**C**) y DTMR + AB (**F**). La escala representa 50  $\mu\text{m}$ .

#### 4.2.2 Intercambio de trazadores

En este experimento se intercambiaron los trazadores DTMR y DA utilizados en el experimento 1 para las MNs de los fascículos largo y lateral, respectivamente. Se obtuvo un número similar de perfiles neuronales para el fascículo largo y lateral (t-test,  $p = 0.667$ ) independientemente del trazador utilizado, confirmando que el transporte de estos trazadores no difiere sustancialmente a pesar de tener diferente estructura y peso molecular (Fig. 4.9).



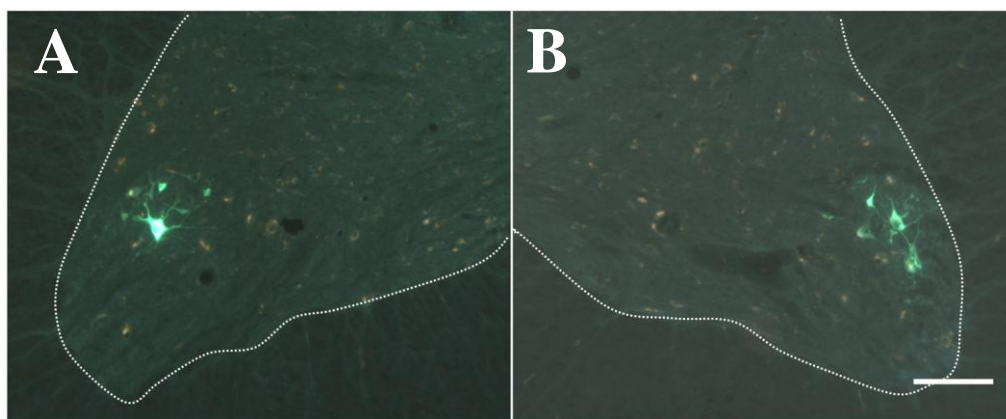
**Figura 4.9.** *Intercambio de trazadores.* **A)** Imagen de parte de las subcolumnas de MNs que inervan el fascículo largo y el lateral marcadas retrógradamente con DTMR (rojo) y DA (verde). **B)** Muestra las mismas subcolumnas marcadas en la extremidad contraria con los trazadores intercambiados, de manera que las MNs del fascículo largo aparecen con DA y las del lateral con DTMR. La proporción de neuronas para cada fascículo se mantiene a pesar de intercambiar el trazador. CR, craneal; CA, caudal. La escala representa 50  $\mu$ m.

#### 4.2.3 Inyección intramuscular de AB

Las MNs cuantificadas en los experimentos 1 y 2 para el fascículo lateral fueron la tercera parte de las del fascículo medial. Este hecho pareció inicialmente contradictorio al considerar que el fascículo lateral pesó casi el doble que el fascículo medial (Tabla 4.2). A raíz de este hallazgo, nos pareció necesario descartar la posibilidad de que las estimaciones neuronales para el fascículo lateral fueran incorrectas debido a un marcaje incompleto del subnúcleo motor por no haber identificado todas las ramas que inervan este fascículo. Con el fin de resolver esta incógnita, realizamos una disección muy cuidadosa del miembro anterior y no encontramos ninguna rama adicional del nervio radial o de otro nervio que inervara el fascículo lateral. Una prueba más concluyente se consiguió al inyectar el trazador retrogrado AB directamente en los fascículos lateral y medial, un fascículo distinto en

cada extremidad. El volumen de trazador fue proporcional al peso del fascículo y las inyecciones se hicieron paralelas a las fibras musculares para evitar su difusión.

La inyección del trazador en el fascículo lateral resultó muy sencilla gracias al gran tamaño y la localización superficial de este fascículo. Sin embargo, la localización más profunda y el reducido tamaño del fascículo medial dificultaron la técnica de inyección. El número de MNs marcadas para el fascículo lateral fue similar al obtenido con la técnica de marcaje por axotomía de la rama del nervio, y el número de neuronas marcadas para el fascículo medial fue todavía significativamente superior al obtenido para el fascículo lateral (t-test,  $p < 0.05$ ), a pesar de que las dificultades quirúrgicas produjeron un marcaje inferior al obtenido por axotomía en este último caso (Fig. 4.10).



**Figura 4.10.** MNs marcadas tras la inyección intramuscular de AB. En las imágenes se muestran perfiles de neuronas del fascículo lateral (A) y del medial (B) en un corte transversal de la ME. La escala representa 100  $\mu$ m.

#### 4.2.4 Estudio de las asimetrías anatómicas entre lados derecho e izquierdo.

Realizamos un triple marcaje bilateral con los mismos trazadores y no encontramos diferencias ( $p = 0.382$ ) entre los dos lados del cuerpo en cuanto al número de MNs para ninguno de los fascículos.

### 4.3 ANÁLISIS ESTRUCTURAL DEL TB

En la tabla 4.2 se muestran las mediciones obtenidas de cada fascículo del TB en la rata, cuyas principales características comentamos a continuación.

	<b>Fascículo Largo</b>	<b>Fascículo Lateral</b>	<b>Fascículo Medial</b>	<b>Total ó promedio</b>
<b>Peso (g)</b>	1.53 ± 0.03 (72 %)	0.36 ± 0.01 (18 %)	0.20 ± 0.01 (10 %)	2.1 ± 0.03
<b>Área transversal (mm<sup>2</sup>)</b>	87 ± 5	25 ± 1	23 ± 1	135 ± 7
<b>Número de fibras</b>	23,016 ± 1,392	4,476 ± 231	6,469 ± 176	34,052 ± 1622
<b>Número de MNs<sup>1</sup></b>	232 ± 11	25 ± 1	94 ± 13	333 ± 16
<b>Tasa de Inervación<sup>(2)</sup></b>	99	179	69	102
<b>Valor medio CSA de las fibras (µm<sup>2</sup>)</b>	3,750 ± 168	5,107 ± 99	2,762 ± 26	3,298 ± 42
<b>Número de fibras tipo 1</b>	7,598 ± 1,030 (36 ± 4 %)	1,525 ± 86 (35 ± 2 %)	3,100 ± 565 (46 ± 9 %)	11,811 ± 1288
<b>Número de fibras tipo 2A</b>	2,378 ± 435 (11 ± 1 %)	327 ± 36 (7 ± 1 %)	2,201 ± 716 (31 ± 9 %)	4,379 ± 432
<b>Número de fibras tipo 2B</b>	10,788 ± 672 (53 ± 5 %)	2,624 ± 246 (58 ± 3 %)	1,626 ± 205 (23 ± 2 %)	16,569 ± 524
<b>CSA fibras tipo 1 (µm<sup>2</sup>)</b>	2,262 ± 131	2,344 ± 40	2,455 ± 38	2,348 ± 31
<b>CSA fibras tipo 2A (µm<sup>2</sup>)</b>	2,645 ± 190	3,741 ± 122	2,928 ± 70	3,151 ± 84
<b>CSA fibras tipo 2B (µm<sup>2</sup>)</b>	5,457 ± 212	5,488 ± 77	2,853 ± 50	4,526 ± 93

**Tabla 4.2.** Características del TB completo y de sus fascículos. El área transversal media (CSA) de las fibras y el área transversal de cada fascículo se midieron en secciones tomadas de la porción intermedia del vientre muscular y procesadas con la tinción de Van Gieson. El análisis de las fibras se hizo en 10 cuadrados (500 µm x 500 µm) de una cuadrícula colocada al azar sobre la imagen de cada sección de tejido analizado. El total de fibras musculares se obtuvo extrapolando el número contado en el área acotada por los cuadrados al área transversal de cada fascículo. El mismo procedimiento se utilizó para cuantificar el número y tamaño de los distintos tipos de fibras en el músculo procesado para ATPasa. Los datos se presentan como la media ± SEM.

<sup>1</sup> Número de MNs obtenido en el experimento 1 con la técnica de la cuantificación absoluta, del cual se ha eliminado un 22 % que corresponde a presuntas γ-MNs. <sup>(2)</sup> La tasa de inervación se calculó como el cociente del número de fibras musculares y de MNs para cada fascículo.

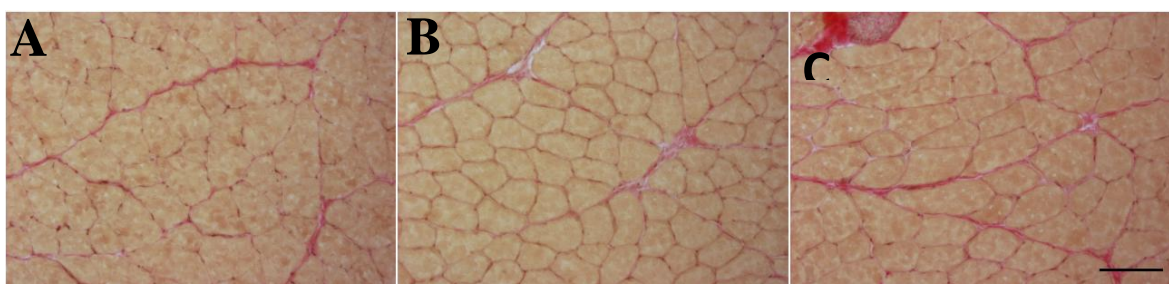


### 4.3.1 Proporción en peso y tamaño de los fascículos

Existen diferencias evidentes en el peso de los tres fascículos (ANOVA de una vía,  $p < 0.001$ ; posttest de Holm-Sidak,  $p < 0.05$ ). El fascículo largo representa el 72 % del peso total del músculo, seguido por el lateral y el medial, que representan el 18 % y 10 % del peso total, respectivamente. El fascículo largo, acorde con su gran peso tiene la mayor área transversal, con una media de  $87 \pm 5 \text{ mm}^2$  que alcanza diferencias estadísticamente significativas con respecto al medial y al lateral (ANOVA de una vía,  $p < 0.001$ ; posttest de Dunn,  $p < 0.05$ ), los cuales presentan áreas transversales similares.

#### a) Cuantificación del número fibras musculares.

El número de fibras musculares también mostró diferencias estadísticamente significativas entre los tres fascículos (ANOVA de una vía,  $p < 0.001$ ; posttest de Dunn,  $p < 0.05$ , Fig. 4.11). Conforme con su tamaño, el fascículo largo presenta el mayor número de fibras con respecto al medial y al lateral, pero en estos últimos la relación entre tamaño y número de fibras no se mantiene. A pesar de que el lateral pesa casi el doble del medial, posee cerca de un 30 % menos de fibras musculares (t-test,  $p < 0.001$ ). Esta aparente contradicción se explica por las diferencias existentes en el tamaño medio de las fibras musculares de estos dos fascículos. En promedio, el área transversal de las fibras del fascículo medial es aproximadamente la mitad de las del fascículo lateral (t-test,  $p < 0.001$ ). Por su parte, las fibras del fascículo largo presentan un área transversal intermedia entre los valores obtenidos para los fascículos lateral y medial. Un aspecto relevante es que al estudiar la distribución estadística del área de las fibras en este fascículo se encontró que era binomial ( $p < 0.001$ ), lo cual analizado conjuntamente con el valor promedio indica que está compuesto por una mezcla de fibras de tamaño grande y pequeño, más que por la presencia de fibras homogéneas de tamaño intermedio.



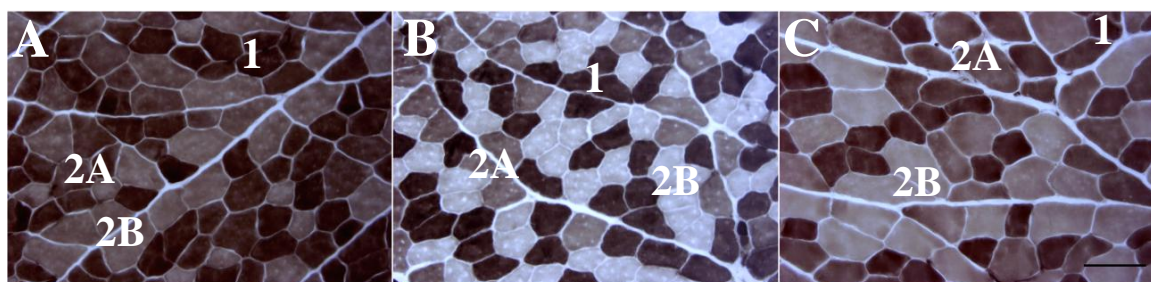
**Figura 4.11.** Fibras musculares del TB teñidas con Van Gieson. A) Fascículo largo, B) fascículo medial, C) fascículo lateral. Cortes transversales. La escala representa 100  $\mu\text{m}$ .

### 4.3.2 Cálculo de la Tasa de Inervación

Al cuantificar las fibras musculares y las MNs para cada fascículo pudimos aproximarnos a la *tasa media de inervación*, estimada como el cociente del número medio de fibras musculares del fascículo y de  $\alpha$ -MNs que lo inervan. Para calcular este valor restamos el porcentaje de  $\gamma$ -MNs (22 %) del total de neuronas de cada subnúcleo. De esta manera, las tasas medias de inervación fueron 99, 69 y 179 fibras por MN para los fascículos largo, medial y lateral, respectivamente. Aunque estos valores son un promedio de los tamaños de las unidades motoras, los resultados indican de forma consistente que cada fascículo tiene una arquitectura neuromuscular especializada. Así, el fascículo medial parece estar compuesto principalmente por fibras musculares y unidades motoras de pequeño tamaño, el fascículo lateral se compone de fibras musculares y unidades motoras de gran tamaño, y el fascículo largo está formado por una mezcla de fibras y unidades motoras pequeñas y grandes.

### 4.3.3 Análisis de los tipos de fibras musculares por histoquímica para ATPasa

Se encontraron variaciones en la composición de cada fascículo que se correlacionan con los hallazgos histológicos y las cuantificaciones neuronales descritas. Aunque el tejido de los tres fascículos fue procesado simultáneamente para la ATPasa, la intensidad de marcaje para el mismo tipo de fibra muscular no fue homogénea entre los fascículos, lo que parece demostrar que dentro de la clasificación global que se hace de las fibras musculares existen diferencias bioquímicas propias de cada fascículo. A pesar de esto, nuestros resultados muestran que el fascículo medial tiene la mayor proporción de fibras pequeñas tipo 1 y 2A (t-test,  $p < 0.05$ ). Mientras que más de la mitad de las fibras de los fascículos lateral y largo son de tipo 2B, estas sólo representan un 23 % de las fibras del fascículo medial (t-test,  $p < 0.05$ ; Fig. 4.12).



**Fig. 4.12.** Fibras musculares del TB teñidas mediante histoquímica para ATPasa. A) Fascículo largo, B) fascículo medial, C) fascículo lateral. Cortes transversales. Según se indica, las diferentes tonalidades de color corresponden a fibras tipo 1, 2A y 2B,. La escala representa 100  $\mu$ m.



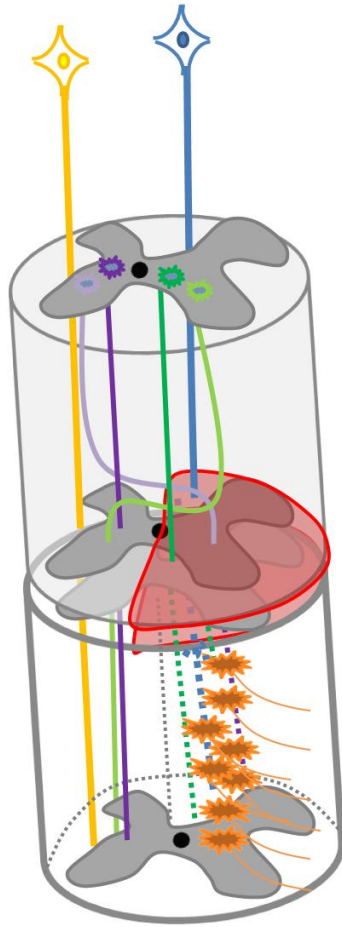
Con respecto al tamaño de las fibras, encontramos que las fibras tipo 2 son más grandes que las de tipo 1 en los fascículos largo y lateral, siendo el área transversal de las fibras tipo 2B > 2A > 1 (ANOVA de una vía,  $p < 0.001$ ; posttest de Dunn,  $p < 0.05$ ). Notoriamente, esta relación de tamaño entre las fibras no se observó en el fascículo medial, cuyas fibras tipo 2 fueron en promedio solo ligeramente más grandes que las tipo 1, sin que la diferencia alcanzase valor estadísticamente significativo (t-test,  $p = 0.24$ ). Así, aunque las fibras que componen el fascículo medial se pueden diferenciar por su metabolismo oxidativo a través del procesamiento histoquímico para la ATPasa, todas sus fibras musculares son pequeñas y muy parecidas entre sí.

#### **4.4 MODIFICACIONES EN LOS CIRCUITOS NEURONALES DEL TB TRAS UNA LESIÓN MEDULAR**

Uno de los objetivos de este trabajo ha sido establecer un modelo de lesión medular cervical en el que se puedan evaluar los cambios anatomofisiológicos en circuitos neurales específicos que participen directamente en la locomoción o en los movimientos voluntarios de la extremidad anterior. Un modelo de tales características nos permitirá investigar estrategias de reparación neural con la posibilidad de establecer una correlación clara entre la conectividad neural y las funciones perdidas. Con este fin, hemos puesto a punto la hemisección medular en el lado derecho del segmento C6, justo al inicio de la columna de MNs del TB. Esperábamos desinervar masivamente estas neuronas, ya que se interrumpirían los axones supraespinales descendentes, así como los que provengan de neuronas propioespinales ubicadas entre C1 y C5 (Fig. 4.13). Naturalmente, también se lesionarían los axones que ascienden por el lado derecho.

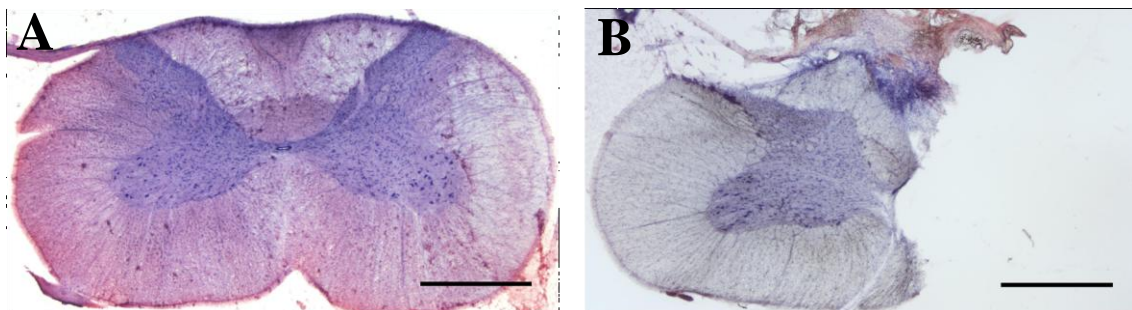
##### **4.4.1 Supervivencia de las MNs del TB tras hemisección medular en C6**

Evaluamos si la desinervación masiva causaba muerte transneuronal en el núcleo motor del TB. Inicialmente se estudió un grupo de animales que recibieron la hemisección en la porción distal de C6 y que sobrevivió por 6 meses, periodo en el cual se les realizó un detallado estudio biomecánico de la locomoción cuyos resultados hacen parte de otra tesis doctoral actualmente en desarrollo. A los 6 meses se aplicaron los trazadores retrógrados según se describió en el apartado de *Materiales y Métodos*.



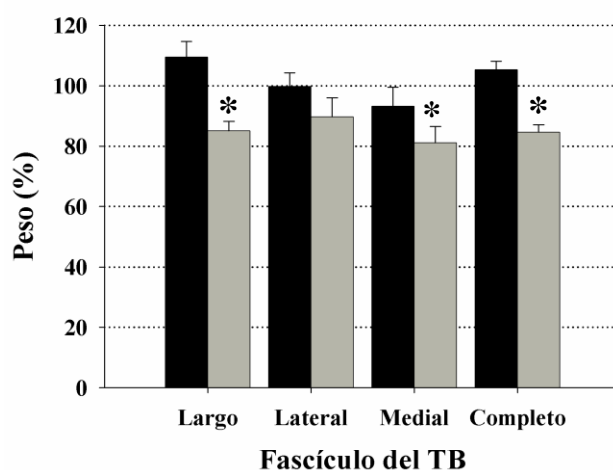
**Fig. 4.13.** *Modelo de lesión medular.* Se representan los dos segmentos medulares adyacentes a la zona de hemisección (banda roja) y algunas de las vías axonales descendentes (supraespinales, azul y amarillo; propioespinales, morado y verde). La lesión interrumpe axones que provienen de neuronas ubicadas ipsilateral o contralateralmente. Los fragmentos axonales que sufren degeneración Walleriana se representan con líneas discontinuas. Las neuronas del segmento C7 (p. ej. las MNs del TB que se representan en color naranja) se desinervan masivamente en el lado ipsilateral, mientras que en el otro lado permanecerán inervadas normalmente.

En el grupo de animales con 6 meses de evolución se encontró que la lesión abarcó  $1.2 \pm 0.3$  mm en el sentido longitudinal de la médula comprendidos entre la parte distal de C6 y la región proximal de C7. La lesión siempre comprometió la mayor parte de la hemimédula derecha, aunque frecuentemente se conservaron pequeñas porciones de la sustancia blanca ventromedial del lado lesionado (Fig. 4.14). En algunos casos también se afectó parte de los fascículos grácil y tracto corticoespinal del lado contralateral.



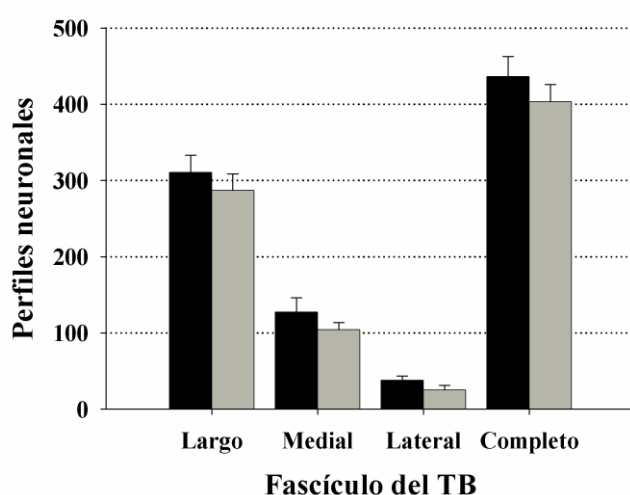
**Figura 4.13.** *Hemisección de la médula espinal en C6.* Secciones transversales teñidas con H-E. **A)** Médula normal, **B)** Médula con lesión. La escala representa 1 mm.

No se observaron cambios en la distribución de las MNs del TB como consecuencia de la lesión. El número total de MNs en el lado ipsilateral a la lesión tendía a ser algo menor que en el lado sano ( $363 \pm 17$  vs.  $437 \pm 37$ ), aunque el tamaño del grupo experimental y la variabilidad de los datos no permitió que la diferencia (17 %) fuera estadísticamente significativa (t-test,  $P = 0.240$ ). Sin embargo, cuando se comparó por separado el número de MNs de la región de la médula que comprendía la zona de lesión y el tejido inmediatamente adyacente (C6 y la mitad proximal de C7), se encontró una pérdida estadísticamente significativa de neuronas en el lado lesionado (t-test,  $p < 0.01$ ); mientras que en la región distal de C7 junto con C8 y T1 no hubo pérdida (t-test,  $p = 0.963$ ). Analizada por subnúcleos, la pérdida perilesional de neuronas solo fue estadísticamente significativa para el fascículo largo ( $p < 0.05$ ), sin muerte significativa en ninguno de los tres subnúcleos en la parte distal. Por otra parte, en este grupo de animales investigamos la presencia de atrofia muscular para ver si guardaba correspondencia con la desinervación, y encontramos que efectivamente el lado lesionado perdió masa muscular en un  $15 \pm 2$  % con respecto al no lesionado (t-test,  $P < 0.001$ ). Aunque todos los fascículos de la extremidad ipsilateral a la lesión disminuyeron su peso con respecto a la extremidad contralateral, el fascículo medial fue el más afectado con reducción del  $19 \pm 5$  % ( $P < 0.05$ ), mientras que el largo perdió  $15 \pm 3$  % (t-test,  $p < 0.01$ ) y el lateral un  $10 \pm 6$  %, aunque esta última diferencia no fue estadísticamente significativa (Fig. 4.14).



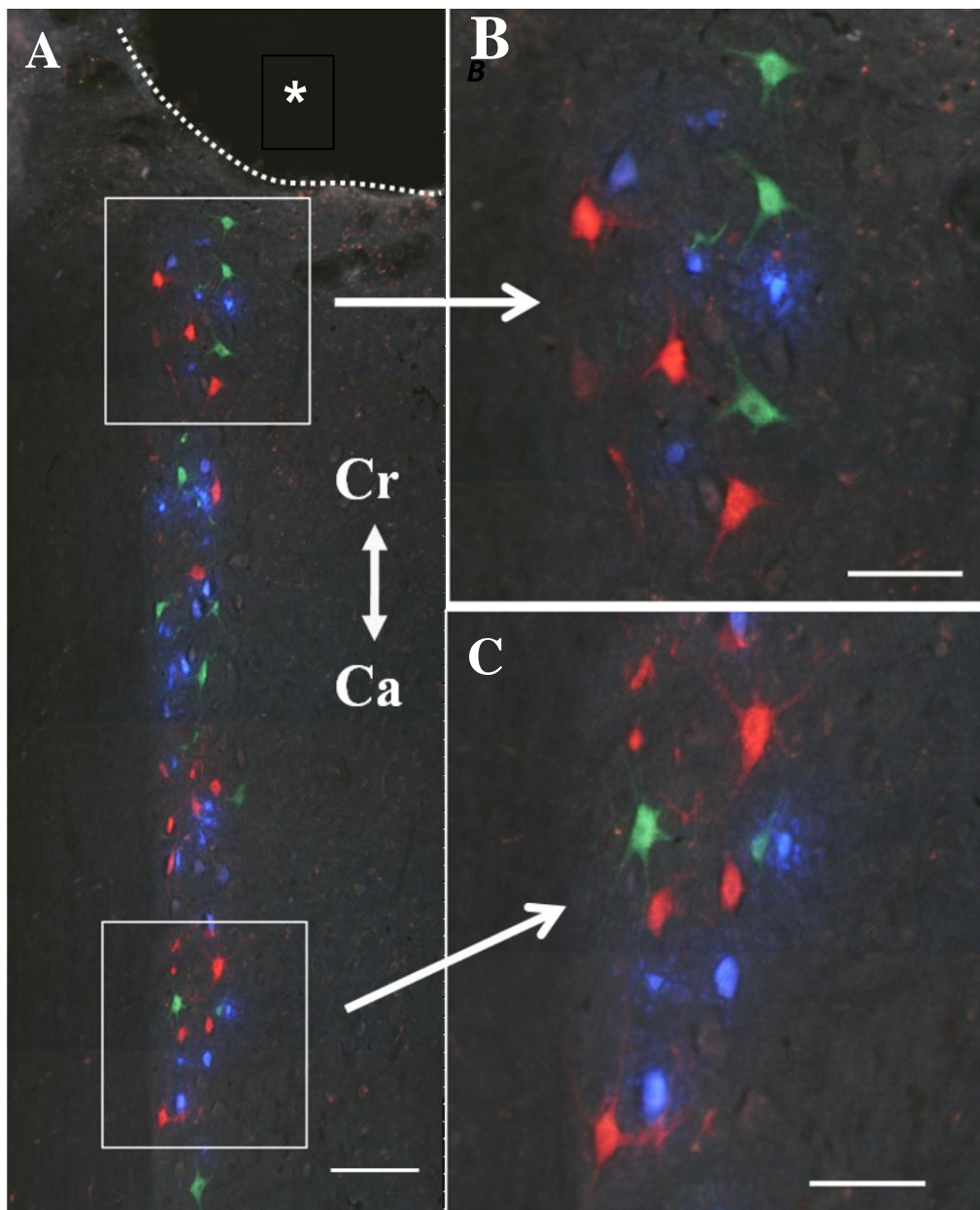
**Figura 4.14.** Reducción del peso de los fascículos de TB. En la gráfica se representa la diferencia del peso de los fascículos de la extremidad derecha con respecto a los de la izquierda, comparando el grupo control (negro) con el grupo lesionado de 6 meses de evolución (gris). Los datos se representan como la media  $\pm$  SEM.

Considerando la extensión de la lesión en este primer grupo de animales, nos preguntamos si las MNs perdidas en la parte proximal de la columna se debían a muerte directa por los fenómenos de hemorragia e inflamación en la zona de lesión, o si representaban un fenómeno de muerte transináptica. Para esto estudiamos un segundo grupo de animales (B) en los que realizamos la lesión en la mitad de C6, un milímetro más craneal que en el primer grupo. Con esto esperábamos disminuir la muerte directa de MNs en la porción proximal de la columna pero aún producir su desinervación masiva. Los animales se sacrificaron a las 6 semanas postlesión. En este grupo la lesión midió  $1 \pm 0.2$  mm, similar al valor del grupo anterior, pero aquí el promedio de MNs contadas en el lado lesionado fue más parecido al del lado sano, registrando una disminución del 9 % que no fue estadísticamente significativa (t-test,  $p = 0.376$ ). Además, también se comparó el número de MNs del lado derecho con respecto a controles completamente sanos, y tampoco se encontraron diferencias (Fig. 4.15).



**Figura 4.15.** Cuantificación de los perfiles neuronales del TB marcados 6 semanas después de la hemisección en C6. Se muestra el número de perfiles encontrados en la hemimédula derecha del grupo control (negro) y del grupo con lesión (gris). Los datos se

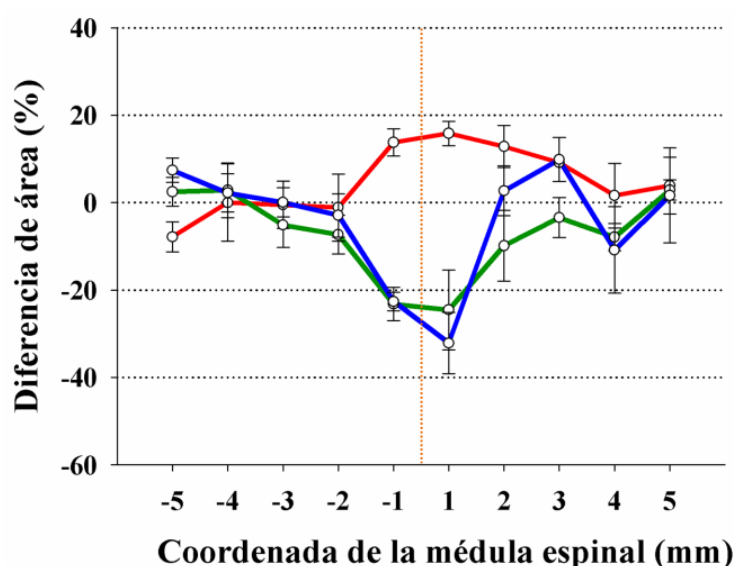
Resulta importante mencionar que las MNs cercanas a la zona de lesión tenían buena apariencia (Fig. 4.16), con dendritas y sin signos obvios de atrofia en el soma. Además, la innervación independiente de cada fascículo parece mantenerse invariable después de la lesión medular, ya que solo ocasionalmente se encontraban neuronas con aparente doble marcaje, con una frecuencia aproximada del 2 %. Sin embargo, no se estableció con certeza que fueran neuronas doblemente marcadas ya que no se analizaron con microscopía confocal.



**Figura 4.16.** MNs del TB en el segmento medular (C7) inmediatamente caudal a la lesión. **A)** Corte horizontal de la médula 6 semanas tras la lesión (asterisco). Las MNs del fascículo largo se marcaron con DTMR (rojo), las del medial con FB (azul) y las del lateral con DA (verde). La escala representa 200  $\mu$ m. En la izquierda se amplían los detalles de las neuronas ubicadas justo en el borde de la lesión (**B**) ó aproximadamente 2 mm caudal (**C**) a ella, pero aún en C7. La escala representa 100  $\mu$ m. CR (craneal); CA (caudal).

#### 4.4.2 Cambios sinápticos en los segmentos cervicales tras hemisección en C6

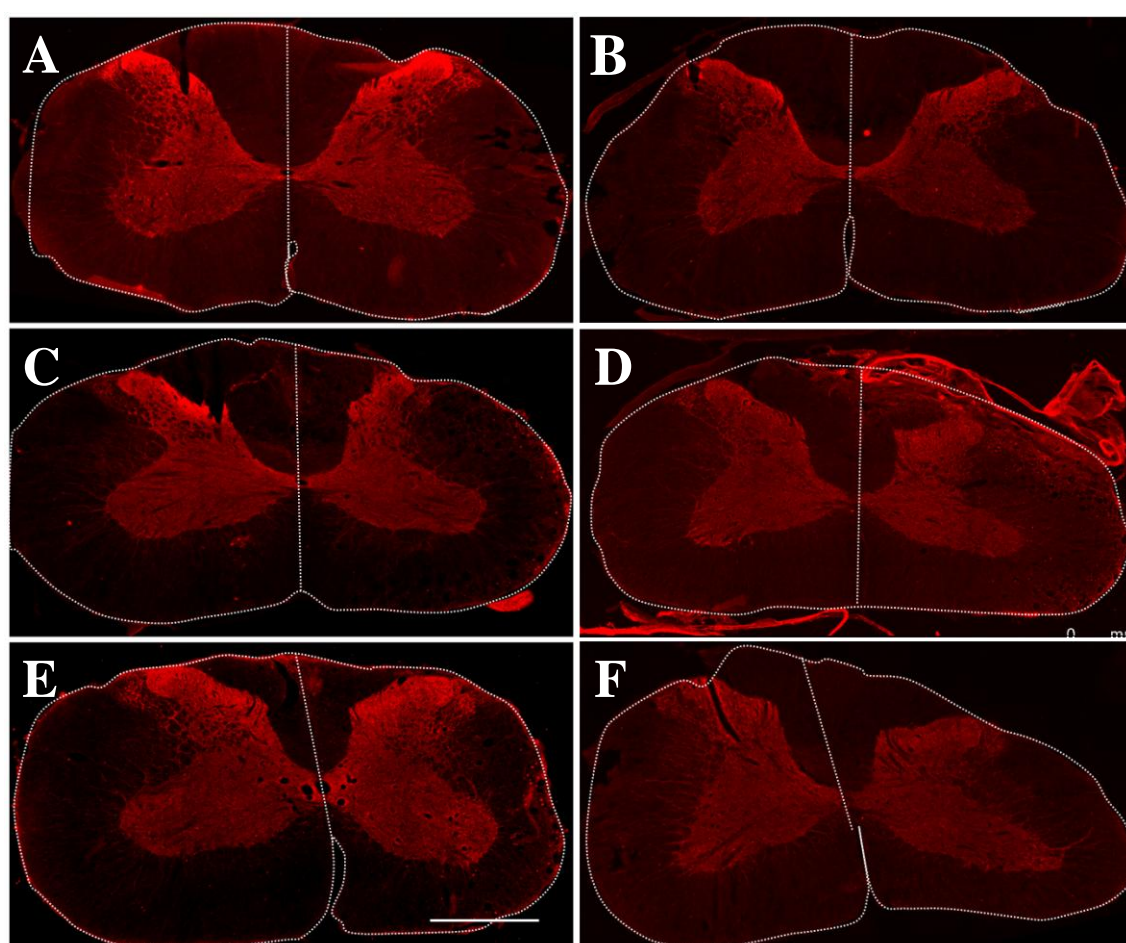
Habiendo demostrado que no hay una muerte transináptica en el núcleo motor del TB después de la hemisección, procedimos a estimar los cambios sinápticos (mediante inmunohistoquímica para sinaptofisina) en los segmentos cervicales desinervados. Inicialmente se midió el área marcada para sinaptofisina en secciones transversales de la ME y se comparó el resultado a lo largo de su eje longitudinal. En los dos grupos con lesión (1 y 3 meses de evolución) se detectó una disminución importante del área marcada para sinaptofisina ipsilateral a la lesión, tanto en comparación con el lado contralateral del mismo animal como con el grupo sano (ANOVA de dos vías,  $p < 0.001$ ; Fig. 4.17). El mayor descenso se encontró en la zona perilesional comprendida entre -1 y +1, aunque al mes de lesión también existía reducción en la coordenada +2 (post-test de Holm-Sidak,  $p < 0.05$ ), que se encontraba normalizada a los 3 meses. La pérdida de área reactiva para sinaptofisina afectó significativamente a las regiones dorsales y ventrales de la sustancia gris (ANOVA de dos vías,  $p < 0.001$ ; post-test de Holm-Sidak,  $p < 0.05$ ), pero no a la región intermedia. De nuevo, los grupos de 1 y 3 meses de lesión eran diferentes en la coordenada +2, pero solamente para la región ventral que se encontró disminuida al mes (t-test,  $p < 0.01$ ) y normalizada a los 3 meses.



**Figura 4.17.** Área marcada para sinaptofisina después de hemisección medular en C6. Se representa el porcentaje de cambio del lado ipsilateral a la lesión con respecto al lado contralateral. La zona de lesión se identifica con la línea vertical naranja, las coordenadas craneales con signo negativo y las caudales con signo positivo. Rojo, grupo sano; verde, grupo 1 postlesión; azul, grupo 3 meses postlesión. Los datos se representan como la media  $\pm$  SEM.

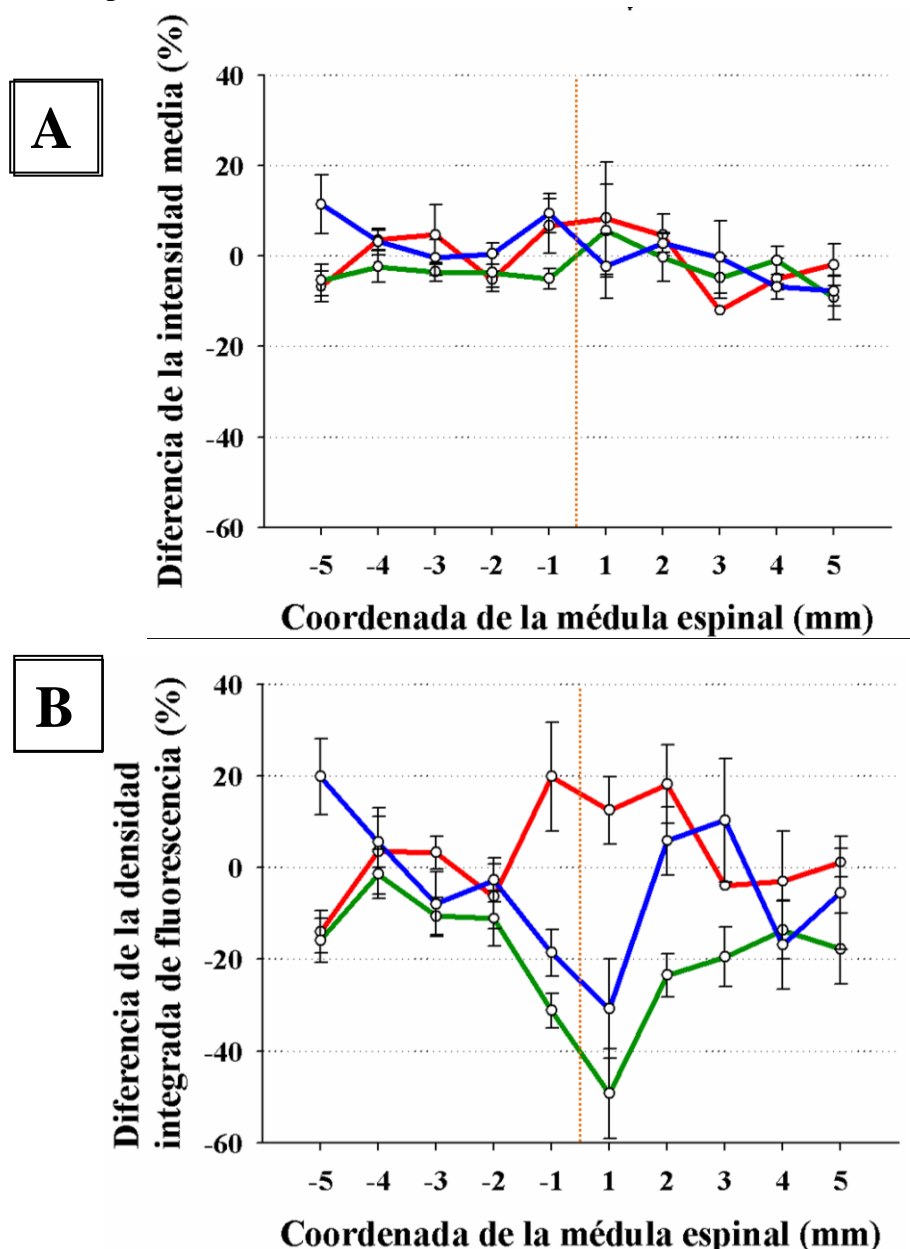


La disminución del área reactiva para sinaptofisina en los segmentos medulares adyacentes a la zona de lesión debería estar directamente relacionada con la degeneración de las sinapsis después de axotomía de los tractos axonales ascendentes y descendentes. Sin embargo, la atrofia de otros elementos celulares en esos segmentos también podría disminuir el área de la sustancia gris. Pensamos que si se disminuyera el área de la sustancia gris sin reducir la cantidad de sinapsis, éstas se concentrarían produciendo un incremento de la intensidad de fluorescencia, pero tal incremento no era evidente en la sustancia gris desinervada (Fig. 4.18).



**Figura 4.18.** *Marcaje para sinaptofisina después de hemisección medular C6.* En el papel aparecen imágenes de cortes transversales de la ME. **A y B)** médula control; **C y D)** médula con lesión de 1 mes de evolución; **E y F)** médula con 3 meses de evolución. Las imágenes en A, C y E se han tomado 1 mm craneal a la zona de lesión (o su equivalente en el control); mientras que B, D y F corresponden a 1 mm caudal a la lesión. Se ha delineado cada hemimédula para una mejor comparación. El lado derecho de la médula está siempre al lado derecho de la imagen. La escala representa 1 mm.

Para apreciar más claramente este fenómeno, decidimos comparar la variación de la intensidad de sinaptofisina en cuanto al promedio y la densidad integrada de la fluorescencia (Fig. 4.19), tomando siempre la variación del valor de la hemimédula derecha con respecto a la izquierda, de manera que se eliminaban buena parte de las fuentes de error en la medición.

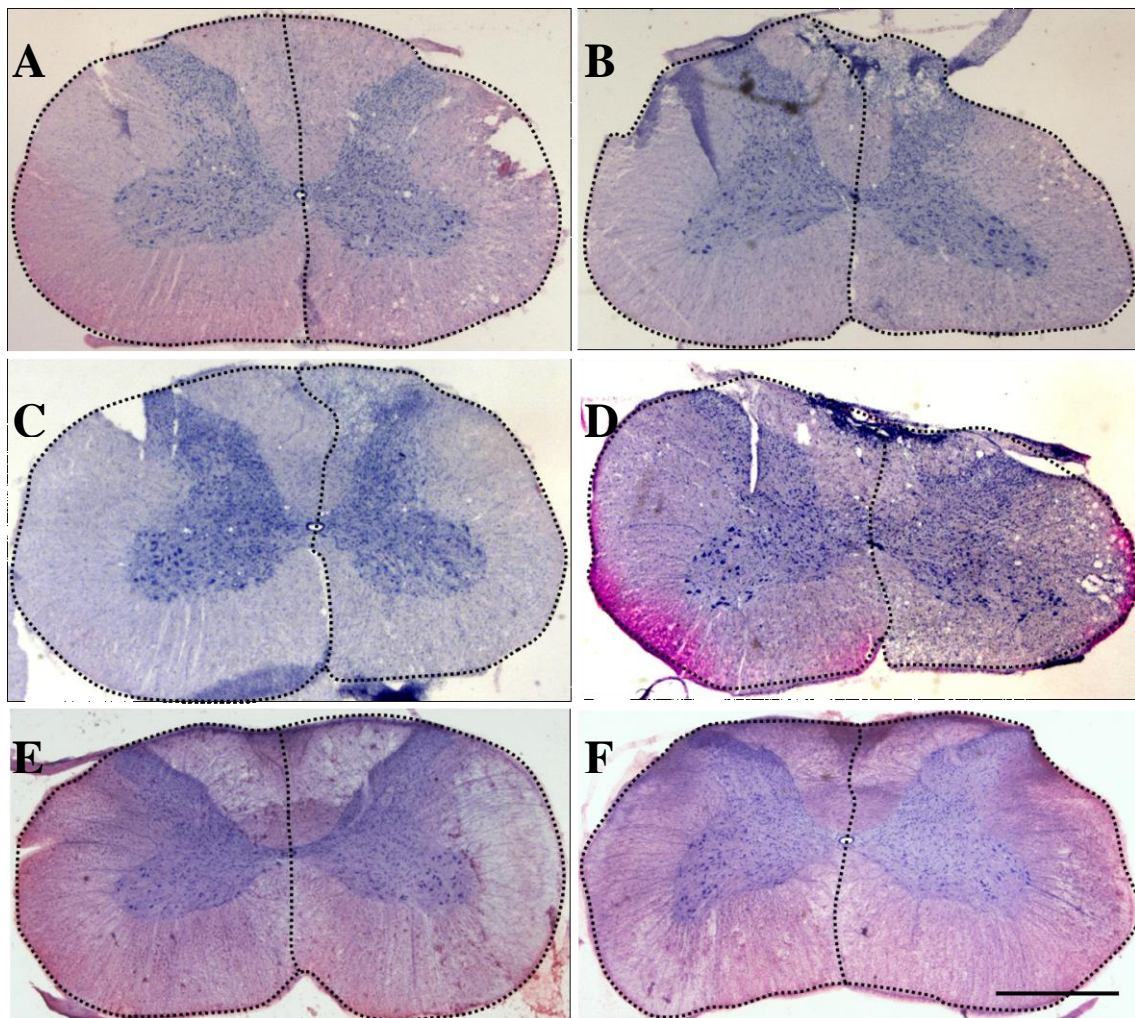


**Figura 4.19.** *Modificación del marcaje para sinaptofisina tras hemisección en C6.* Se representa el porcentaje de cambio del lado ipsilateral a la lesión con respecto al contralateral. **A)** Intensidad media de la fluorescencia; **B)** densidad integrada de la fluorescencia. La zona de lesión se identifica con la línea vertical naranja, las coordenadas craneales con signo negativo y las caudales con signo positivo. Rojo, grupo sano; verde, grupo 1 postlesión; azul, grupo 3 meses postlesión. Los datos se representan como la media  $\pm$  SEM.



Como puede observarse en la Fig. 4.19, la intensidad media de fluorescencia no varía después de la lesión, manteniéndose en torno a cero en todas las coordenadas y tanto en los animales sanos como en los que tenían lesión. En cambio, el cálculo de la densidad integrada acentuó las diferencias entre las coordenadas de la médula después de la lesión, tanto cuando se consideró de forma global para la hemimédula o pormenorizada por regiones. Así, existe una notable reducción del valor en la zona próxima a la lesión (entre -1 y +2 mm), siendo similares para ambos tiempos postlesión los valores en -1 y +1, pero observándose una recuperación de la densidad integrada en la coordenada +2 a los 3 meses con respecto al grupo de 1 mes tanto (t-test,  $p < 0.01$ ).

Con el fin de obtener una idea general sobre los cambios anatómicos en los segmentos adyacentes a la lesión, se tiñeron con H-E secciones contiguas de las utilizadas para analizar la sinaptofisina. En la Fig. 4.20 se muestra la apariencia de la médula en las coordenadas -1 y +1. Observamos una evidente atrofia de la hemimédula ipsilateral a la lesión con respecto al otro lado. La sustancia blanca muestra zonas de degeneración Walleriana en ambos sentidos, como corresponde a la degeneración de los tractos axonales ascendentes y descendentes. La degeneración parece más avanzada a los 3 meses postlesión, a juzgar por la mayor vacuolización de la sustancia blanca. Por su parte, la sustancia gris presenta cambios consistentes con las mediciones del área reactiva para sinaptofisina descritas anteriormente, con reducción evidente del área en la hemimédula afectada, tanto en la región dorsal como en la ventral. La región caudal a la lesión se ve afectada de forma más dramática, aunque no parece haber una muerte neuronal importante, por lo menos en la región ventral, en la que se ven numerosas neuronas con buen aspecto. A pesar de que no hemos evaluado la muerte de neuronas segmentarias diferentes de las motoneuronas, los datos de la inmunohistoquímica para sinaptofisina junto con los contajes de las MNs del TB y la apariencia de la médula teñida con H-E indican que la hemisección en C6 causa una desinervación masiva con pérdida persistente de sinapsis en C7. Además, el segmento inmediatamente rostral a la lesión también parece experimentar una desinervación crónica.

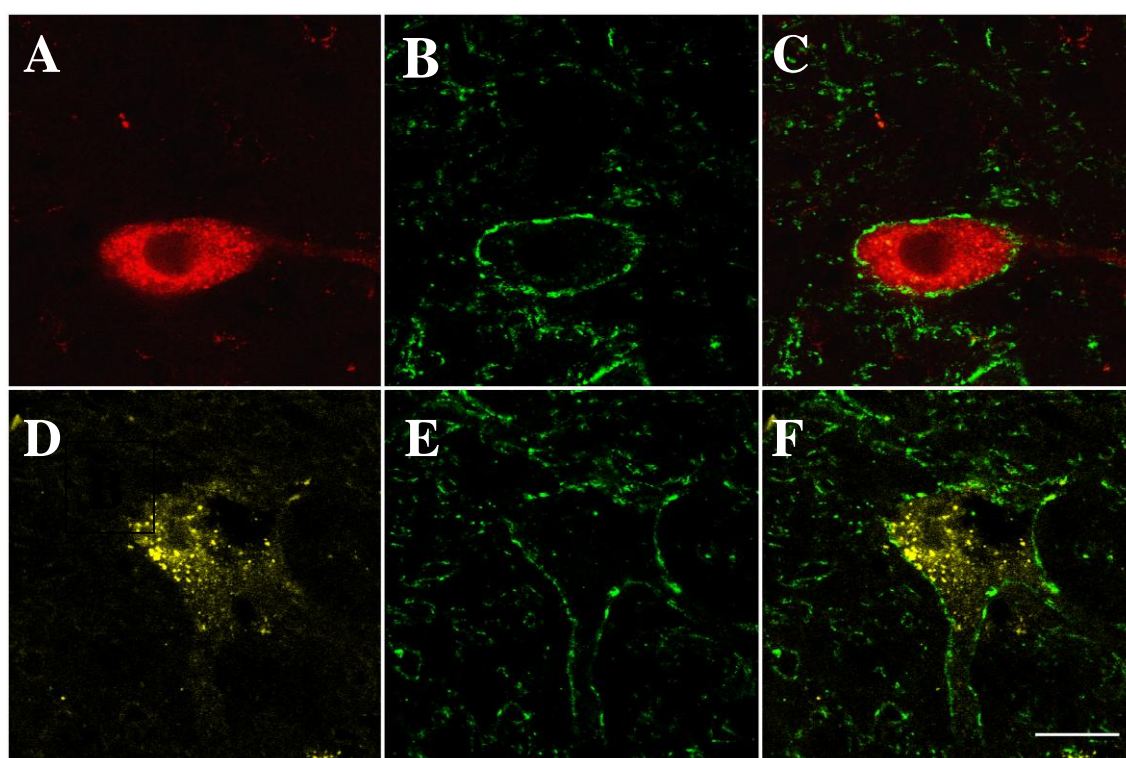


**Figura 4.20.** *Cambios generales en los segmentos de la médula espinal adyacentes a la zona de hemisección.* En el papel se muestran cortes transversales de la ME teñidos con H – E y localizados a 1 mm craneal (A, C y E) ó caudal (B, D y F) a la zona de lesión (o su equivalente en el caso control). A y B) médula con lesión de 1 mes de evolución; C y D) médula con 3 meses de evolución. E y F) médula control. Se ha delineado cada hemimédula para una mejor comparación. El lado derecho de la médula está siempre al lado derecho de la imagen. La escala representa 1 mm.

#### 4.5 EFECTO DE LA AXOTOMÍA DE LAS MNs SOBRE LA DENSIDAD SINÁPTICA AFERENTE.

Después de los estudios descriptivos de las MNs que inervan el TB en condiciones de normalidad y tras una lesión medular, disponemos de nociones básicas que nos permitirán investigar más específicamente los circuitos que controlan los subnúcleos en

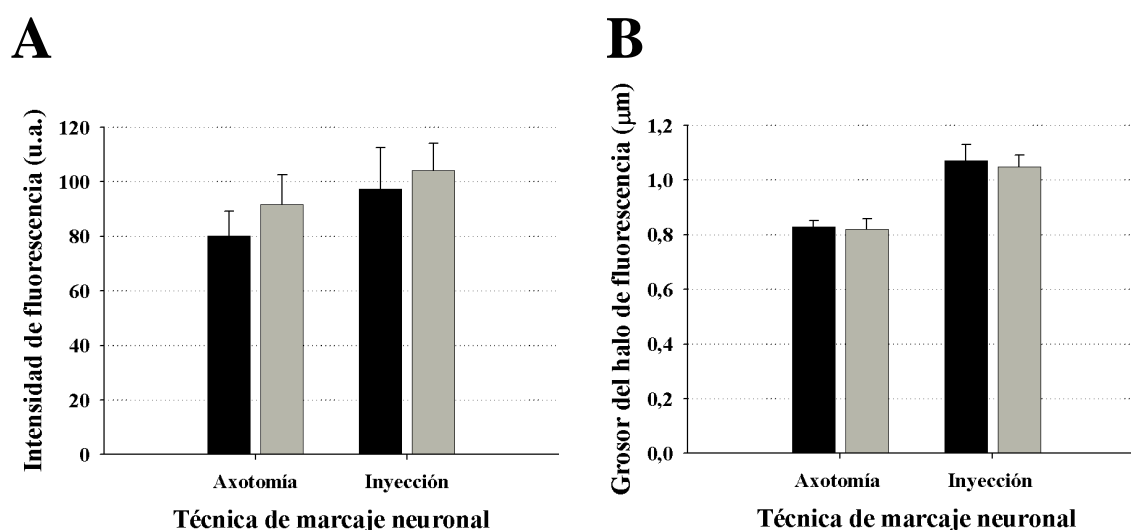
condiciones de normalidad y su modificación después de la hemisección. En este sentido, nos preguntamos primero si la técnica de marcaje de las MNs por axotomía del nervio es apropiada o interferirá con los estudios de conectividad sináptica. Comparamos entonces la densidad sináptica (medida por la inmunorreactividad para sinaptofisina) sobre las MNs del TB marcadas retrógradamente en animales sin lesión medular, aplicando el trazador mediante axotomía (DTMR) o intramuscularmente sin axotomía (AB), bilateralmente. Los cambios se evaluaron en las MNs que inervan los fascículos lateral y medial, marcándolas en un lado axotomía y en el otro por inyección intramuscular (Fig. 4.21).



**Figura 4.21.** *Análisis de los cambios en la inmunorreactividad para sinaptofisina según la técnica de marcaje neuronal empleada.* En el panel superior se muestran imágenes confocales de una MN del TB marcada retrógradamente con DTMR (rojo) por axotomía del nervio, y en el panel inferior se muestra una MN marcada con AB por inyección intramuscular sin axotomía. La sinaptofisina se ha revelado con un anticuerpo secundario conjugado con Alexa Fluor 488 (verde). Se muestran separadas las imágenes del marcaje de las MNs (A, D), de la sinaptofisina (B, E) y las imágenes fusionadas (C, F). La escala representa 25  $\mu\text{m}$ .

Las mediciones obtenidas de la intensidad y el grosor del halo fluorescencia se muestran en la Fig. 4.22. A los 3 días encontramos una disminución media de un 23 % en la intensidad de fluorescencia para sinaptofisina en la superficie del soma de las neuronas axotomizadas del fascículo lateral en comparación con los valores obtenidos en neuronas que captaron el trazador de la placa motora (t-test,  $p < 0.05$ ), lo que indica que los cambios sinápticos ya son perceptibles en ese momento. En las neuronas del fascículo medial también hubo una tendencia a la disminución (13 %), aunque la diferencia no alcanzó a ser estadísticamente significativa.

Cuando se analizó el grosor del halo de fluorescencia se encontraron cambios más parecidos para los dos subnúcleos, encontrándose una reducción de aproximadamente un 22 % en los casos de axotomía con respecto a los trazados por inyección intramuscular. En este caso la estadística si mostró diferencias significativas en función de la técnica de marcaje empleada ( $p < 0.001$ ), pero no entre los subnúcleos de los fascículos analizados.



**Figura 4.22.** *Inmunorreactividad para sinaptofisina sobre las MNs del TB.* **A)** Promedio de la intensidad de fluorescencia para sinaptofisina. **B)** Grosor medio del halo de marcaje. Las mediciones para el subnúcleo del fascículo lateral se muestran en negro y las del medial en gris. Los datos se representan como la media  $\pm$  SEM.

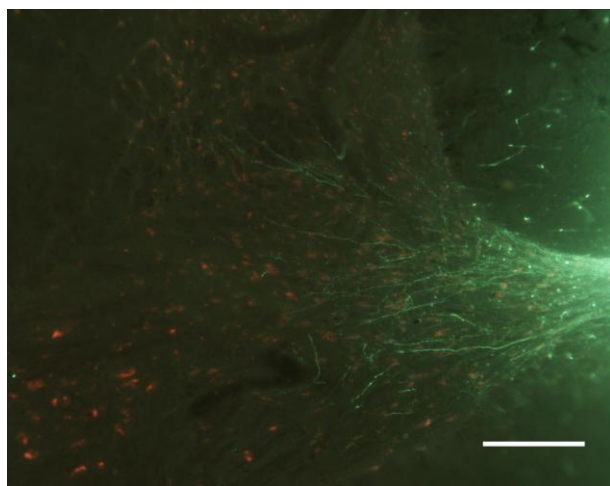


#### 4.6 NEURONAS SUPRAESPINALES Y PROPIOESPINALES QUE PROYECTAN A C7.

Según hemos mencionado, la lesión en C6 debería interrumpir los posibles axones propioespinales de los segmentos cervicales C1 a C5. La existencia de una proyección importante proveniente de esta región podría explicar la desinervación masiva y persistente del segmento C7 tras la hemisección, pero se desconocen prácticamente por completo las características de estos sistemas en la rata. Decidimos entonces cuantificar, de forma general, las neuronas cervicales que proyectan a C7, trazándolas mediante la inyección de AB en la región intermedia del asta derecha de C7 (2 puntos separados 1 mm, 0.2  $\mu$ l en cada punto).

##### 4.6.1 Aproximación cualitativa inicial

Injectamos el trazador y estudiamos las estructuras marcadas en 3 animales sacrificados después de 6, 24 y 72 horas. A las 6 horas se encontraron neuronas positivas para AB en una región de aproximadamente 5 mm en el eje longitudinal de la ME, desde la porción distal de C5 hasta C8. No hubo neuronas marcadas en las estructuras supraespinales y tampoco se observó difusión del trazador a la hemimédula contralateral. Además se marcaron numerosos axones comisurales (Fig. 4.23).



**Figura 4.23.** *Marcaje de fibras comisurales cerca al canal central. Médula espinal fijada 6 horas después de la inyección intramedular de AB en C7. La escala representa 200  $\mu$ m.*

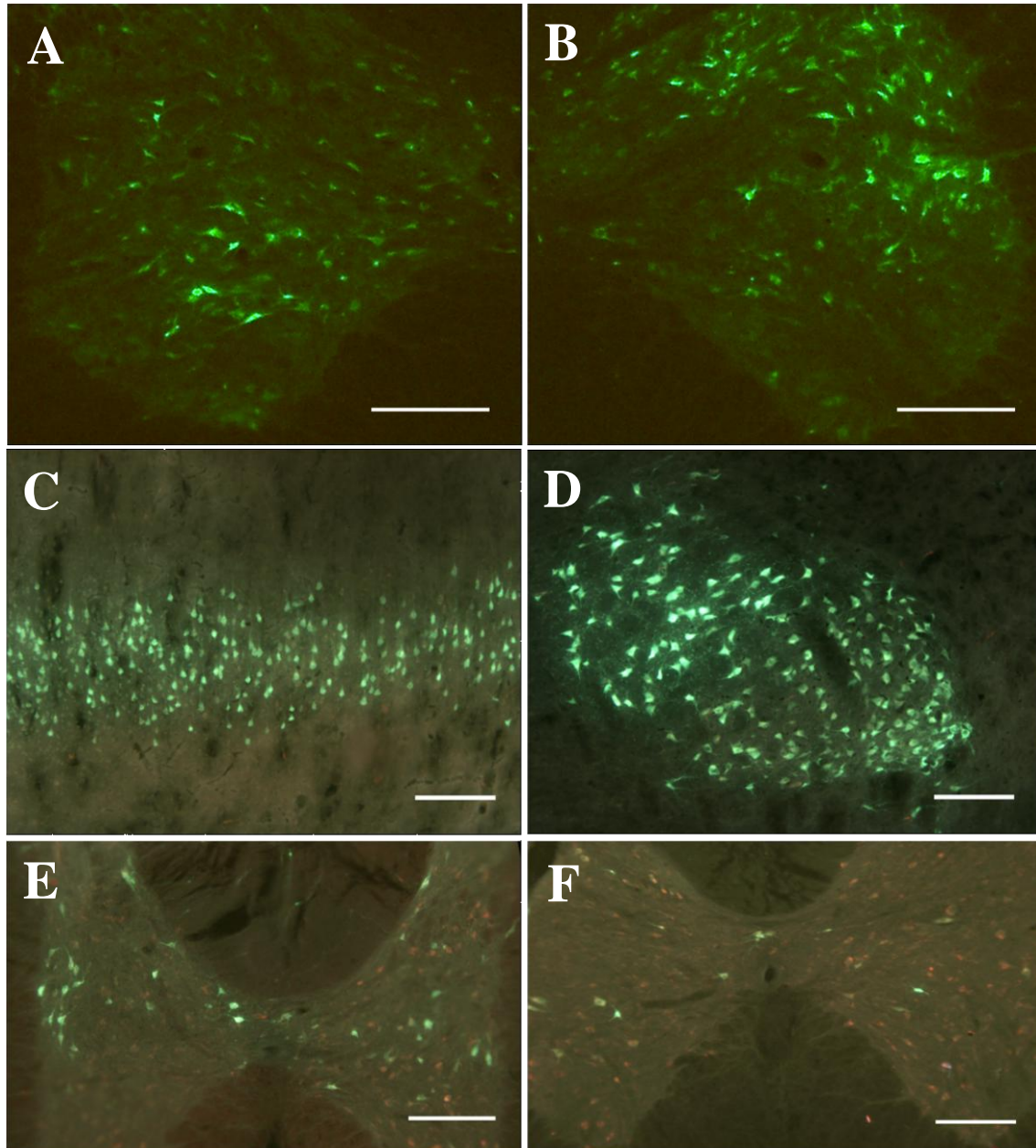
Tras 24 horas se marcaron intensamente neuronas en la ME lumbar y cervical distales a la inyección, y también supraespinales, llegando hasta el núcleo rojo. En el lado de la médula contralateral a la zona de inyección se observó cierta fluorescencia de fondo posiblemente atribuible a difusión del trazador, aunque la presencia de grupos

específicos de neuronas intensamente marcadas indicó que el principal marcaje ocurrió por transporte axonal retrógrado. A las 72 horas aparecieron perfiles de neuronas marcadas con muy buena intensidad en la corteza cerebral, y también se observó más difusión del trazador de la zona de inyección a los segmentos medulares limítrofes. De estos resultados podemos inferir que la velocidad de transporte de la AB se encuentra entre aproximadamente 20 y 70 mm / día. En la tabla 4.3 se resumen las estructuras marcadas con cada tiempo de supervivencia.

Estructuras marcadas e intensidad de la fluorescencia			
	6 h	24 h	72 h
<b>C7 (inyección)</b>	Fluorescencia intensa. Poca difusión. Axones comisurales.	Ipsilateral: lámina 9 muy marcada. Lámina 7 contralateral y ganglio C8.	Marcaje muy intenso ipsilateral y contralateral en láminas 5, 6, 7, 8 y 10.
<b>C3- C6</b>	Sólo en C5 – C6. Marcaje de axones en la zona dorsal e intermedia.	Láminas 1 a 8 ipsilaterales. Ganglio C6. Láminas 7 y 8 y región lateral del asta dorsal contralateral.	Ipsilateral similar a las 24 h. Ganglio C5. Contralateral: neuronas cerca de núcleos lateral y cervical espinal (C3) y láminas 7, 8 y 9 (C5-C6).
<b>T9 – T10</b>	Negativo	Núcleo intermediolateral ipsilateral. Núcleo dorsal. Láminas 10 y 7 bilaterales.	Similar a las 24 h pero más intenso.
<b>L2 – L4</b>	Negativo	Marcaje bilateral de las láminas 10 y 7 (más intenso en el lado contralateral).	Marcaje bilateral de las láminas 10, 7, 8 y 4.
<b>Cerebro</b>	Negativo	Núcleos vestibulares medial, y lateral (mayor en el lado izquierdo), núcleo reticular parvocelular (bilateral), n. reticular gigantocelular (más intenso en el lado izquierdo), núcleo paragigantocelular posterior, núcleos del rafe, núcleo rojo (izquierdo mucho más intenso).	Adicionalmente a lo marcado a las 24 h: fórceps menor del cuerpo calloso, núcleo preóptico del hipotálamo, núcleo intermedio del lemnisco lateral (bilateralmente), capa V de la corteza motora primaria (izquierda mucho más intensa). Corteza somatosensorial secundaria izquierda.

**Tabla 4.3.** Estructuras marcadas 6, 24 y 72 h después de la inyección de AB en C7. La inyección se realizó en la hemimédula derecha.

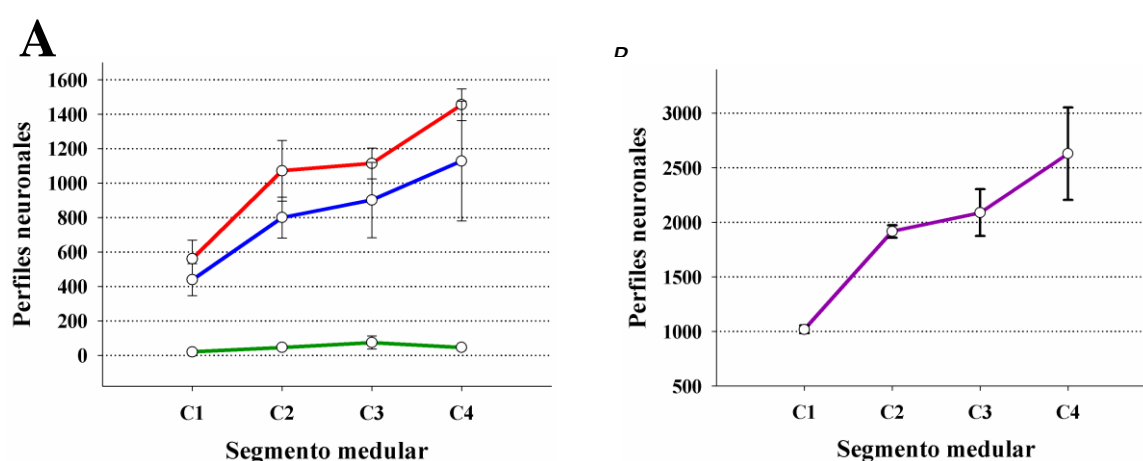
Con este ensayo inicial establecimos que 1 y 3 días son apropiados para marcar las neuronas propioespinales y supraespinales, respectivamente (Fig. 4.24).



**Fig. 4.24.** *Marcaje neuronal por inyección intramedular de AB en C7. A) y B), marcaje 24 h post-inyección; C), D), E) y F), marcaje 72 h post-inyección. A) Neuronas propioespinales en el lado contralateral de C3; B) Neuronas propioespinales en el lado ipsilateral de C3; C) Corteza motora primaria contralateral; D) Núcleo rojo contralateral; E) Segmento medular T10; F) Segmento medular L2. En todas las fotografías la escala representa 200  $\mu$ m.*

#### 4.6.2 Cuantificación y distribución segmentaria global de las neuronas que proyectan al lado derecho de C7 desde C1 a C4.

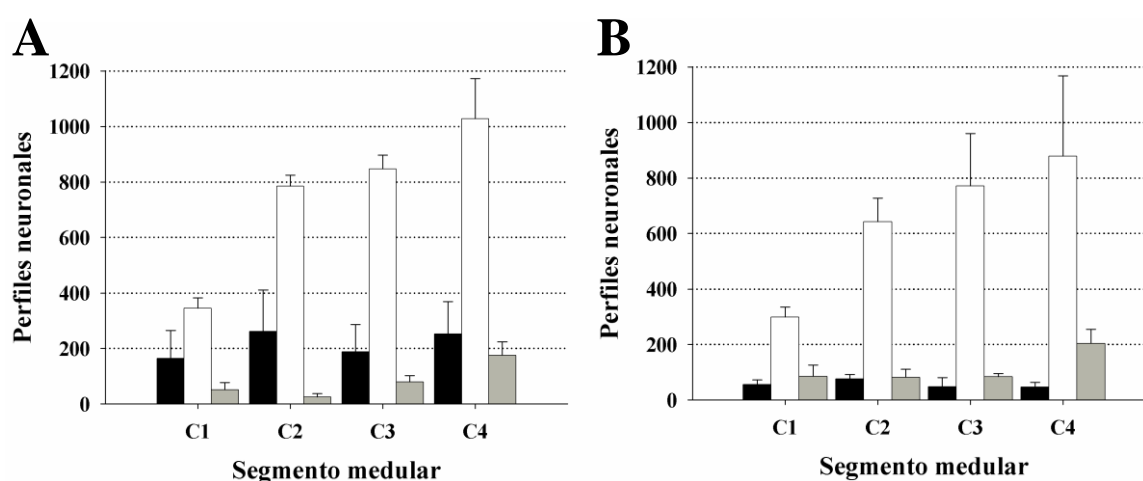
Procesamos un primer grupo de animales 24 h post-inyección y encontramos un número muy importante (aprox. 7500 contando secciones alternas) de perfiles de neuronas propioespinales marcadas en los segmentos C1 a C4 (Fig. 4.25), distribuidas tanto en la sustancia gris ipsilateral ( $56 \pm 8 \%$ ) como en la contralateral ( $42 \pm 8 \%$ ); además, un  $2 \pm 0.4 \%$  de las neuronas estaban en la lámina 10. La distribución de las neuronas mostró ciertas particularidades con respecto al segmento medular, localización en la sustancia gris (dorsal, intermedia o ventral) y lado ipsilateral o contralateral al lado de inyección (ANOVA de tres vías,  $p < 0.001$  para el segmento medular;  $p < 0.001$  para la región de la sustancia gris;  $p = 0.53$  para el lado de la ME con interacción entre la región y el segmento medular). El número de perfiles de neuronas marcadas en el segmento C1 fue significativamente inferior (post-test Holm-Sidak,  $p < 0.05$ ) que en los otros segmentos, apareciendo en C1 solo el  $13.5 \pm 1 \%$  del total de neuronas cuantificadas, frente al  $25 \pm 3 \%$ ,  $27 \pm 2 \%$  y  $34 \pm 8 \%$  de los segmentos C2, C3 y C4, respectivamente. En todos los segmentos se han encontrado perfiles de neuronas marcadas en la lámina 10, en una proporción relativamente constante y baja. Aunque la tendencia es hacia un número mayor de neuronas de origen ipsilateral, el número de animales estudiados resultó insuficiente para alcanzar diferencias estadísticas.



**Fig. 4.25.** Distribución segmentaria de las neuronas propioespinales que proyectan a C7. **A)** Número de perfiles neuronales marcados con AB en el lado ipsilateral a la inyección (línea roja), en el lado contralateral (línea azul) y en la lámina X (línea verde). **B)** Sumatoria de todas las neuronas marcadas. Los datos se representan como la media  $\pm$  SEM.



Para estudiar la aportación específica de las diferentes regiones de la sustancia gris, ésta se dividió de acuerdo con su citoarquitectura en las regiones: *dorsal*, *intermedia*, *ventral* y *central* (ver Materiales y Métodos). En la Fig. 4.26 se muestra la distribución de las neuronas marcadas en la hemimédula ipsilateral y contralateral a la inyección según esta distinción regional. La mayoría de las neuronas se concentró en la región intermedia de la ME en los segmentos C1 a C4 (ANOVA de una vía,  $p < 0.001$ ; post test de Holm-Sidak,  $p < 0.05$ ), representando en promedio el  $73 \pm 5 \%$  del total. En la región dorsal del lado ipsilateral a la inyección encontramos una gran variabilidad en la cuenta de perfiles marcados, pero en cualquier caso son alrededor de 4 veces más numerosos que en la misma región del lado contralateral.



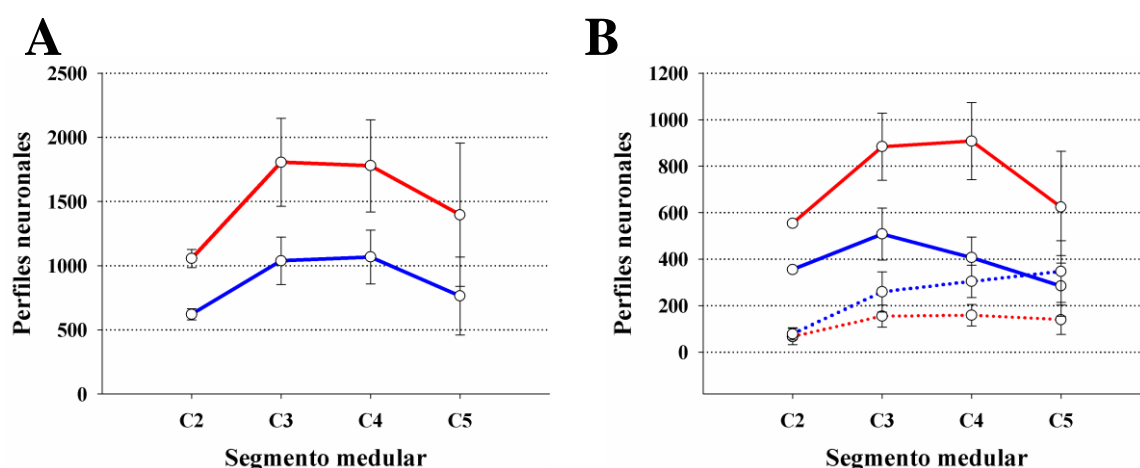
**Figura 4.26.** Número de perfiles neuronales marcados en la *región dorsal* (negro), *intermedia* (blanco) y *ventral* (gris) de la sustancia gris del lado ipsilateral (**A**) y contralateral (**B**) a la inyección de AB en C7. Los datos se representan como la media  $\pm$  SEM.

#### 4.6.3 Cuantificación de las proyecciones desde las láminas 7 y 8 de los segmentos C2 a C5 hasta el lado derecho del segmento medular C7.

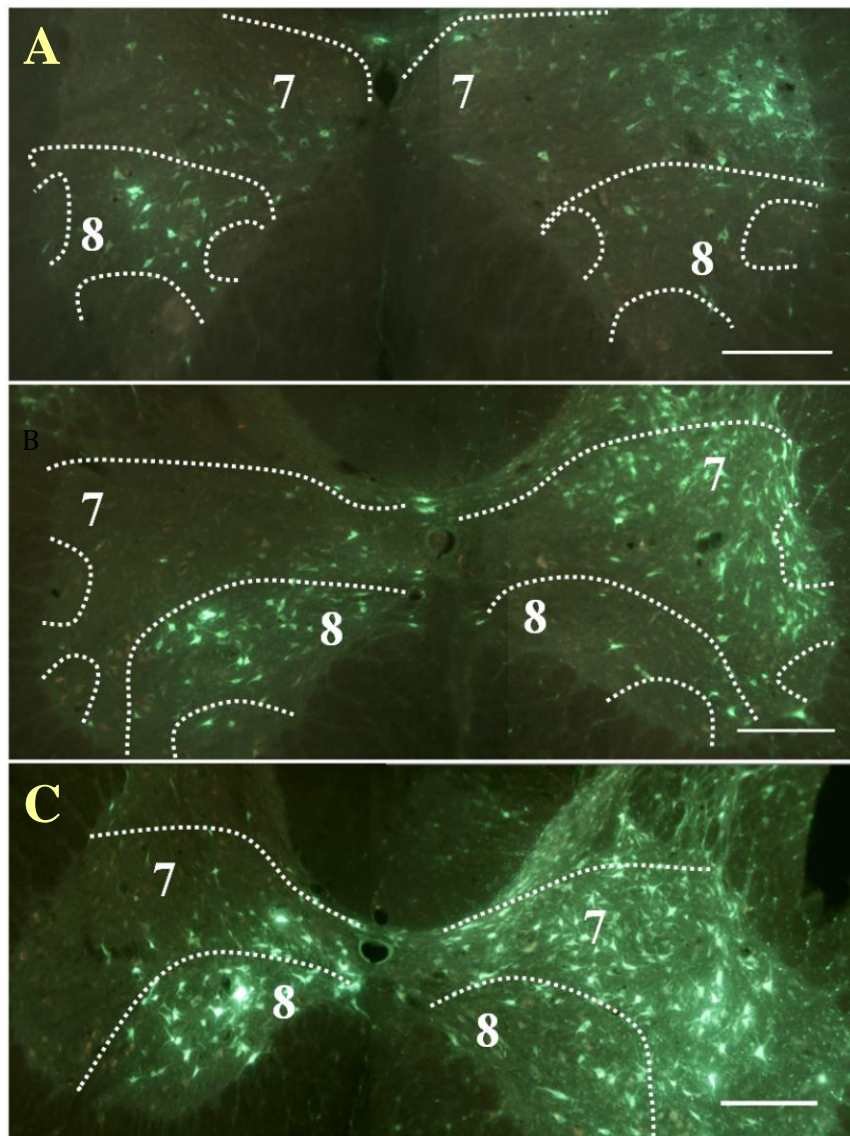
En un experimento adicional analizamos exclusivamente las láminas 7 y 8, en donde se localizan la mayoría de INs premotoras (Jankowska 2001). Además, incorporamos C5 en el análisis, ya que entre C1 y C4 habíamos observado un incremento progresivo de neuronas en la zona intermedia. En general, confirmamos los hallazgos anteriores y obtuvimos nuevas evidencias en la distribución regional específica de las neuronas que proyectan desde el lado ipsilateral y contralateral de la ME. En todos los segmentos analizados aparece un patrón similar de distribución de las

neuronas en las laminas 7 y 8, pero con particularidades en cada lado de la ME (Fig. 4.27 y 4.28). De igual forma que ocurrió en el experimento anterior tanto en el lado ipsilateral como el contralateral se encontraron numerosas neuronas, con un número algo mayor en el ipsilateral. En ambos lados se incrementó sustancialmente el número de neuronas de C2 a C3 (67 % y 77 % para el lado contralateral y el ipsilateral, respectivamente,  $p < 0.01$ ), pero entre C3 y C4 no hubo diferencias. Finalmente, en C5 la cantidad de neuronas marcadas tiende a disminuir, observándose un 28 % menos en el lado ipsilateral y un 11 % menos en el contralateral, aunque sin diferencia estadística.

Merece la pena reseñar las diferencias interesantes que se encontraron entre los dos lados de la médula. El número de perfiles de neuronas contados en la lámina 7 fue siempre superior ipsilateralmente (ANOVA de dos vías,  $P < 0.001$ ; post-test de Holm-Sidak,  $p < 0.01$ ), llegando a ser más del doble en C4. Además, las neuronas de la lámina 7 ipsilateral se encuentran principalmente en la zona lateral, mientras en el lado contralateral se encuentran casi exclusivamente en la zona medial (Fig. 4.28). En ambos lados se observó una tendencia al descenso de C4 a C5 en el número de neuronas de la lámina 7, pero no se alcanzó diferencia significativa. Por otra parte, tomadas en conjunto las neuronas marcadas en la lámina 8 desde C2 hasta C5, se encontró aproximadamente el doble de neuronas en el lado contralateral (Post-test de Holm-Sidak,  $p < 0.05$ ). En este lado existe un aumento progresivo en el número de neuronas en la lámina 8 desde C2 hasta C5, mientras que en el lado ipsilateral tiende a disminuir.



**Figura 4.27.** A) Distribución segmentaria del total de perfiles neuronales marcados en las laminas 7 y 8 de la *hemimédula ipsilateral* (línea roja) y *contralateral* (línea azul) a la inyección de AB. B) Número de perfiles neuronales marcados considerados por separado en la *lámina 7* (línea continua) y *8* (línea discontinua) del *lado ipsilateral* (línea roja) y *contralateral* (línea azul) a la hemimédula inyectada. Los datos se representan como la media  $\pm$  SEM.



**Figura 4.28.** *Distribución de las neuronas que proyectan a C7.* En las imágenes se muestra como se reproduce el patrón específico de distribución de la neuronas encontradas en las láminas 7 y 8 de los segmentos C3 (A), C4 porción proximal (B) y C4 porción distal (C). El lado derecho de la médula (ipsilateral a la inyección) se encuentra siempre al lado derecho de las

## *5. Discusión*

En este trabajo investigamos la anatomía normal de los fascículos del TB y de las neuronas que los inervan mediante el uso de múltiples trazadores neurales retrógrados en combinación con técnicas de histología convencional e histoquímica para ATPasa. Los métodos permitieron la identificación y cuantificación fidedigna de las motoneuronas espinales y de las fibras musculares. Demostramos que cada fascículo está controlado por un subnúcleo independiente de MNs; el más grande es del fascículo largo, seguidos por los del medial y el lateral. En la médula espinal, los tres subnúcleos se encuentran entremezclados en la parte rostral de la columna de MNs, mientras que la parte caudal contiene neuronas principalmente para el fascículo largo. La estimación del número de fibras musculares y la cuantificación del número absoluto de MNs mostró diferencias muy claras entre los tres compartimentos. El fascículo medial está formado predominantemente por fibras pequeñas tipo 1 y unidades motoras pequeñas (69 fibras / MN). Por el contrario, el fascículo lateral contiene una gran cantidad de fibras grandes tipo 2b y unidades motoras grandes (179 fibras / MN), mientras que el fascículo largo contiene una mezcla más balanceada de tipos de fibras y unidades motoras (99 fibras / MN). Teniendo en cuenta la heterogeneidad mecánica y fisiológica del TB, nuestros hallazgos indican que los tres fascículos pueden considerarse músculos independientes con funciones específicas. Estos resultados han sido publicados recientemente (Lucas-Osma y Collazos-Castro, 2009).

En la segunda parte del trabajo investigamos la desinervación del segmento medular C7 y la posible muerte transináptica de las MNs del TB después de una hemisección medular en C6. A pesar de la desinervación masiva del segmento C7 causada por la lesión, no encontramos evidencia de muerte transináptica en ninguno de los subnúcleos motores del TB. Aunque aún se requieren varias comprobaciones adicionales, los hallazgos que obtuvimos también indican que el segmento C7 sufre desinervación crónica tras la hemisección; es decir, los procesos de sinaptogénesis reactiva no restauran completamente la densidad sináptica en esta región. Estos resultados explican la detección de trastornos neuromotrices específicos, severos y crónicos en los animales con hemisección medular C6, y serán publicados en forma conjunta con los estudios funcionales (López-Dolado, Lucas-Osma y Collazos-Castro 2011, artículo en preparación). Puesto que también observamos alteraciones de las sinapsis sobre las MNs del TB poco después de su axotomía, el estudio de la

desinervación de cada uno de los fascículos tras la lesión medular requerirá trazados por inyección intramuscular.

Tras la hemisección medular, observamos que solo los segmentos medulares inmediatamente adyacentes a la lesión sufren desinervación crónica. Planteamos entonces la hipótesis de que existe una importante vía propioespinal que da numerosas entradas sinápticas al segmento C7, además de las proporcionadas por los axones que descienden del encéfalo, y que la desinervación crónica de C7 tras hemisección en C6 se debe a que se interrumpen también los axones propioespinales. Como un primer paso para investigar esta hipótesis, estudiamos las neuronas marcadas retrógradamente cuando se inyecta un trazador neural retrógrado en el segmento C7 de la rata normal. Encontramos efectivamente un número muy importante de neuronas entre C1 y C5, con mayor representación en C3 y C4 y con particularidades en cuanto a su localización en cada lado de la médula. El número de neuronas encontradas bien sustenta la hipótesis de que la desinervación crónica tras la hemisección se debe a la interrupción de las vías propioespinales y tiene importantes implicaciones para los estudios de lesión y reparación de la médula espinal.

### **5.1. COMPARTIMENTACIÓN NEUROMUSCULAR Y ARQUITECTURA DEL TRICEPS BRACHII**

Los primeros trabajos en este campo describieron pormenorizadamente la organización de los núcleos motores espinales que inervan los músculos de las extremidades posteriores, utilizando HRP como trazador retrógrado único (Nicolopoulos-Stournaras e Iles 1983; Vanderhorst y Holstege 1997). La HRP también permitió describir la distribución espacial de los núcleos motores de músculos como el pectoral en el perro (Krogh y Towns, 1985), el semitendinoso en el cerdo doméstico (Szentkuti y Bruns, 1983), el trapecio en el gato (Vanner y Rose, 1984) e incluso del TB completo en rata, aplicándolo por inyección dentro del músculo (Bennet y col. 1983; Hasse y Hrycishyn, 1985) o en las ramas del nervio radial (Collazos-Castro y col. 2005). Aunque se considera que, bajo condiciones óptimas, la HRP es captada por el 100 % de las MNs (Swett y col. 1986), la utilización de un único trazador hace que solo se pueda identificar inequívocamente un grupo de MNs en cada lado del animal. Por consiguiente, deben utilizarse animales diferentes para poder comparar la inervación de

varios músculos o fascículos, aumentando el esfuerzo necesario y también introduciendo fuentes adicionales de error en las cuantificaciones. Estas limitaciones fueron superadas gracias al desarrollo y aplicación de múltiples trazadores retrógrados fluorescentes en el mismo animal, lo cual demostró claramente la existencia de compartimentos inervados independientemente en músculos como el diafragma (Gordon y Richmond, 1990), o el sartorio y el tensor de la fascia lata (Gordon y col. 1991). Los resultados de la presente tesis extienden esta información a los fascículos del TB, que también pueden ser considerados como compartimentos neuromusculares separados e incluso como músculos diferentes, si se tiene en cuenta que los tres fascículos presentan diferentes inserciones (y, por consiguiente, acciones mecánicas), tipos de fibras y tasas de inervación, y que se contactan poco entre sí. Quizás un análisis evolutivo revelaría que el TB fue originalmente un músculo más sencillo y que se especializó progresivamente, separando sus componentes anatómica y funcionalmente.

Existen pocos estudios referentes a la relación en peso entre los fascículos del TB. Los valores que hemos descrito en nuestro trabajo en rata se parecen a los obtenidos en el caballo, donde se establece una relación próxima al 84 %, 15 % y 3 % del total del peso del músculo para los fascículos largo, lateral y medial, respectivamente (Watson y Wilson 2007). Nuestros resultados también parecen estar de acuerdo con estudios previos de la composición de fibras musculares en cada fascículo (Fuentes y col. 1998; Fischer 1999; von Mering y Fischer 1999; Matsumoto y col. 2007), excepto por un trabajo en el que no encuentran fibras tipo 1 en el fascículo lateral (Fischer 1999). Esta aparente discrepancia podría deberse al uso de diferentes técnicas para clasificar las fibras musculares. Considerando el gran tamaño del fascículo largo en relación con los otros dos, parece lógico pensar que este fascículo genera buena parte de la fuerza del TB en los mamíferos. En concordancia con esta suposición, el fascículo largo tiene una gran proporción de fibras tipo 2B (más de un 50 % según nuestros datos). A pesar de que los fascículos largo y lateral presentan una composición media de fibras musculares muy similar, los dos pueden tener diferencias funcionales importantes, debidas a la naturaleza biarticular del fascículo largo y a su gran tamaño, cuatro veces la masa del fascículo lateral. Además, el fascículo largo podría estar compuesto por varios subcompartimentos, como parece indicar la regionalización de sus fibras y la división su rama nerviosa justo en la entrada del músculo. Estos subcompartimentos podrían tener

implicaciones funcionales, más que simplemente producir un alto nivel de fuerza al realizar una tarea. En un trabajo realizado en el roedor *Galea musteloides* se obtuvo una reconstrucción tridimensional del fascículo largo, mostrando que existen dos regiones (anterior y posterior) claramente diferenciadas, con fibras de orientación y tamaño diferente, estando las más cortas cerca del hueso (Gorb y Fischer 2000). A pesar de la aparente evidencia, no existen todavía trabajos que analicen la subcompartimentación del fascículo largo y la manera en que la diferente organización de sus fibras se traduce en especificidad biomecánica. Por otro lado, en nuestros datos el fascículo medial presenta el mayor porcentaje de fibras tipo 1, aunque su proporción es menor al 50 % del total y sólo representa un 11 % más que en el resto de los fascículos. Este porcentaje es inferior al obtenido para *Galea musteloides* (von Mering y Fischer 1999), pero es similar al obtenido en un trabajo realizado en humanos (Harridge y col. 1996). Este hecho podría hacernos pensar que el miembro anterior de la rata presenta un mayor grado de especialización para la realización de movimientos finos dirigidos (Iwaniuk y Whishaw 2000), además de su función anti-gravitatoria. Un hecho destacable que enfatiza la peculiar estructura del fascículo medial es el tamaño de las fibras musculares que lo componen. En este fascículo las fibras tipo 2A y 2B presentan un área transversa similar al de las fibras tipo 1, a diferencia de lo que ocurre en los otros dos fascículos en los que el área transversa de las fibras 2A es el doble del que presentan el tipo 1.

## **5.2 TASA DE INERVACIÓN, TIPOS DE FIBRAS MUSCULARES EN EL TRICEPS BRACHII Y SUS IMPLICACIONES FUNCIONALES**

En este trabajo hemos calculado indirectamente el valor medio de la tasa de inervación para cada fascículo a partir de datos morfométricos, resultado del cociente obtenido entre el número de fibras musculares y el número absoluto de neuronas que lo inerva calculado para cada fascículo, excluyendo las  $\gamma$ -MNs. Esta técnica presenta cierta similitud con la forma usada para estimar la tasa de inervación en cadáveres de humanos (Santo Neto y col. 1998; Enoka y Fuglevand 2001; Santo Neto y Marques 2008), con la diferencia de que en estos se contó el número de axones en el nervio, pudiendo sobrestimar las neuronas al no distinguir los axones motores de los sensoriales ni los axones primarios de sus ramas. En animales de experimentación se puede precisar la estimación del número de UMs a partir de la cuenta de axones en nervios periféricos,



eliminando las aferentes sensoriales unas semanas y contando los axones lo más lejos posible del músculo (Eccles y Sherrington, 1930). También hay otras técnicas como el “agotamiento del glucógeno” (Edstrom y Kugelberg, 1968) disponibles para identificar las fibras musculares que pertenecen a una determinada UM (Burke y Tsairis 1973; Bodine y col. 1987; Kanda y Hashizume 1992; Tötösy de Zepetnek y col. 1992; Rafuse y col. 1997). Esta se fundamenta en la estimulación repetida de las fibras que inerva un axón, forzándolas a generar fuerza de forma anaeróbica y, como consecuencia, a obtener energía a partir del consumo del glucógeno intracelular. De esta manera se pueden diferenciar las fibras no activadas de las que han sido activadas por la presencia o ausencia de glucógeno (Lieber 2002). Sin embargo, tal método no está exento de limitaciones: solo puede analizarse una UM en el mismo músculo, sólo sirve en fibras anaeróbicas, los resultados se pueden ver afectados por la geometría muscular y no es aplicable para estudios con humanos (Enoka y Fuglevand 2001).

La combinación que hemos realizado de trazado retrógrado de las MNs junto con análisis de la histología muscular proporciona entonces una buena metodología parece calcular la tasa de innervación, permitiendo obtener valores medios para cada fascículo y sirviendo para dirigir los estudios fisiológicos y bioquímicos adicionales. Como era esperable por los tipos de fibras que componían cada fascículo, la tasa de innervación más pequeña correspondió al fascículo medial y la más grande al lateral, mientras que el largo mostró un valor intermedio. Los tamaños medios que obtuvimos para las UMs del TB de la rata fueron relativamente pequeños en comparación con los músculos de la extremidad posterior del gato, en el cual las UMs de contracción lenta tienen un tamaño próximo a las 100 fibras, y las de contracción rápida tienen alrededor de 300 fibras (Enoka y Fuglevand 2001). Pero nuestros resultados concuerdan con los datos obtenidos por el método del “agotamiento del glucógeno” en músculos de la extremidad posterior de la rata (Enoka y Fuglevand 2001). La clara diferencia en la tasa de innervación entre los fascículos lateral y medial indica el alto grado de especialización de cada uno de ellos. Sin embargo, no debemos olvidar que la complejidad de la función neuromuscular no puede ser explicada exclusivamente por la tasa de innervación media, sino más bien por la variación de la tasa de innervación en el músculo, ya que ésta determina en últimas la proporción del núcleo motor que inerva cada tipo de fibra muscular (Enoka y Fuglevand 2001).

La organización neuromuscular del TB va determinar el reclutamiento de las UMs en la realización de una tarea, aunque para ser entendida debe completarse con estudios fisiológicos. Quizás entenderemos mejor el amplio repertorio de movimientos del miembro anterior en los mamíferos si consideramos cada fascículo del TB como un músculo diferente, ya que vistos así podrían ser activados de forma sinérgica o independiente, como sucede con los otros músculos. Puesto que todos los fascículos contienen una importante cantidad de fibras tipo 1 (más del 35 %) que pertenecen a UMs pequeñas, se puede inferir que una buena parte de las MNs de cada uno de los subnúcleos inerva fibras tipo 1. Enoka y Fuglevand (2001) proporcionan una explicación detallada de este razonamiento, diciendo que para que la mitad de las MNs de un núcleo motor espinal se encarguen de inervar fibras tipo 2, primero debe reducirse hasta cerca de un 10 % la cantidad original de fibras tipo 1. Pero además, cada fascículo contiene también cierto porcentaje de fibras tipo 2A y 2B, lo que permite que sea posible conseguir un reclutamiento progresivo de UMs siguiendo el “principio de tamaño” (Henneman 1957). De esta forma, quizás se activen conjuntamente los tres fascículos en tareas que requieren mucha fuerza para extender el codo ó evitar su flexión). Por el contrario, el fascículo largo podría ser activado preferentemente cuando se necesite ejercer mucha fuerza de forma duradera, y/o cuando se requiera un control sinergista del hombro y codo. Por otro lado, el fascículo lateral intervendría en tareas asociadas con la generación de fuerza de gran intensidad pero durante un breve periodo de tiempo, mientras que en movimientos más precisos y que requieren una menor fuerza de ejecución actuaría el fascículo medial. Esta especialización anatómico-funcional concede la posibilidad de activar selectivamente uno o más compartimentos en función de la tarea a realizar, permitiendo un amplio margen de actuación e incrementando la eficacia en la realización de tareas de gran complejidad. Como dato interesante, la distribución segregada que presentan los diferentes tipos de fibras musculares dentro del TB ha sido observada por otros autores en rata (Fischer 1999; Scholle 2001, Armstrong y Phelps 1984), en otros pequeños mamíferos (Friedhelm 1999; Stanislav 2000) y en los humanos (Terzis y col. 200), pero no en el conejo, que tiene muy poca capacidad de movimientos de agarre con la extremidad anterior (Fuentes y col. 1998).

La localización que hemos encontrado para la columna completa de MNs del TB es similar a la de otros trabajos realizados en rata (Mckenna y col., 2000, Nicolopoulos-

Stournaras y Iles, 1983), primates (Jeny y Inukai, 1983), murciélago (Ryan y col., 1997), ratón e iguanas (Ryan y col., 1998). Se ha propuesto que la ubicación de las columnas de MNs en la ME cervical se asemeja a la organización espacial de los músculos de la extremidad anterior y que por tanto facilita las sinergias motrices para los movimientos dirigidos de agarre (Mckenna y col. 2000). Aunque la rata es capaz de producir movimientos de gran complejidad con su miembro anterior, no existen estudios cinemáticos o EMG comparativos de la actividad de estos músculos durante tareas de agarre. Este tipo de estudios se ha realizado en humanos (d'Avella y col. 2006), mostrando que existen unas pocas sinergias de activación para los músculos del hombro y del brazo durante la realización de movimientos dirigidos rápidos, indicando que el sistema de control se simplifica mediante la recombinación de unas pocas pautas. También se sabe que la ME de los vertebrados es capaz de organizar y combinar sinergias musculares para generar diversos movimientos (Tresch y col. 1999; Hart y Giszter 2004). Con estas premisas, es posible que la organización topográfica de los núcleos motores participe en la simplificación de las pautas de movimiento, aunque por razones diferentes a simplemente facilitar una activación secuencial de los músculos. En el caso del TB, los subnúcleos motores de los tres tipos fascículos se solapan en la parte rostral de la columna donde posiblemente coincidan las señales descendentes que activan sincrónicamente los tres fascículos en ciertas tareas. La activación selectiva de cada uno de los subnúcleos motores se conseguiría por entradas sinápticas diferentes a cada subnúcleo provenientes de neuronas premotoras, sensoriales, supraespinales o propioespinales, en analogía con lo propuesto para ciertos músculos del miembro posterior del gato (Chanaud y col. 1991) o de la mano en el hombre (Keen y Fuglevand 2004). El hecho de que la parte caudal de la columna del TB contenga casi exclusivamente neuronas que inervan el fascículo largo parece indicar que este subnúcleo no comparte todas las entradas con los subnúcleos del lateral y del medial, o bien podría justificar la existencia una división neuromuscular adicional en el fascículo largo que es biarticular. En línea con esta interpretación, los estudios del árbol dendrítico de neuronas que pertenecen al mismo núcleo motor pero que están localizadas en distintos segmentos medulares evidencian conexiones segmentarias o descendentes específicas (Vanner y Rose 1984). La interpretación que hacemos con respecto a la organización de los subnúcleos del TB también se justifica con otros estudios que han mostrado que la topografía de las MNs en la médula no siempre refleja

la organización anatomofuncional de los músculos. Por ejemplo, los dos compartimentos en los que se divide el tensor de la fascia lata están inervados por diferentes grupos de MNs que se encuentran entremezcladas a lo largo de la columna en la médula espinal (Chanaud y col. 1991; Gordon y col. 1991), a pesar de que cada región muscular sigue un patrón específico de activación durante el ciclo de marcha (Chanaud y col. 1991). De forma similar, el músculo masetero está constituido por pequeños compartimentos (Segal 1992; Widmer y col. 2007) que generan un amplio rango de movimientos en torno a la articulación temporomandibular (English y col. 1999) y que pueden ser activados selectivamente según sea necesario (Widmer y col. 2003), a pesar que las columnas de MNs que inervan cada uno de esos compartimentos se encuentran solapadas en el tronco del encéfalo (Saad y col. 1997). La misma observación se ha hecho para el diafragma (Gordon y col. 1991), demostrando que en el reclutamiento selectivo de determinadas regiones los mecanismos fisiológicos tienen mayor relevancia que la localización de las neuronas.

### **5.3 DESINERVACIÓN Y MUERTE TRANSINÁPTICA DESPUÉS DE HEMISECCIÓN MEDULAR EN C6**

Existe abundante bibliografía en la que se presentan evidencias de muerte neuronal transináptica inducida por lesiones de axones sensoriales o motores, incluyendo la muerte de MNs lumbares después de lesiones medulares torácicas (Eidelberg y col. 1989; Eidelberg 1990; Nacimiento y con. 1995; Suzuki et al., 1995; Hama et al., 1996). En el lado opuesto hay una serie de trabajos que desmienten tal patología (McBride et al., 1991; Terao et al., 1999; Bjugn et al., 1997; Anderson y col. 2005). En nuestro trabajo hemos inducido una desinervación máxima de las MNs del TB al realizar la hemisección medular justo en el inicio de la columna. Observamos una ligera disminución en el número de perfiles neuronales marcados en los dos grupos de lesión (de 6 y 22 semanas de evolución) en comparación con sus respectivos controles, pero esta reducción en el número de neuronas puede atribuirse directamente a la necrosis causada por la lesión. Inicialmente decidimos realizar la hemisección en la parte distal de C6, pero el daño se extendió aproximadamente 1 mm comprometiendo el inicio de C7, con lo cual dañamos la parte más craneal de la columna y encontramos

una pérdida del 17 % de perfiles neuronales. Sin embargo, la pérdida se redujo al 8 % al realizar la lesión un poco más cranealmente, en la mitad de C6. Naturalmente, podría pensarse que la diferencia en el tiempo de supervivencia (22 semanas frente a 6 semanas) indujo una mayor pérdida de neuronas por procesos degenerativos y no como consecuencia de la propia lesión, pero varios factores nos llevan a descartar esta posibilidad. Primero, como ya hemos hecho mención, la localización y extensión de la lesión fueron factores claves. Segundo, la muerte de neuronas solo se observó en la parte más craneal de la columna, mientras que otros autores han detectado degeneración transináptica en zonas caudales distantes de la lesión (Eidelberg y col. 1989, Bose y col. 2005). Tercero, el subnúcleo de MNs del fascículo largo fue el más afectado por la lesión, y solamente en la parte más craneal de la columna. No encontramos evidencia de muerte selectiva en el fascículo lateral, que contiene las MNs más grandes y por consiguiente más susceptibles de morir (Kanning y col. 2010). Finalmente, la apariencia de la columna de MNs en la porción inmediatamente caudal a la lesión es muy buena a pesar de la desinervación crónica. En conclusión, aunque no podemos negar taxativamente la degeneración transináptica de algunas MNs, de ocurrir solo afectará a una cantidad muy pequeña de MNs en nuestro modelo de lesión. Después de 22 semanas de lesión también encontramos una reducción de un 15 % en el peso del músculo TB del lado lesionado con respecto al lado contralateral. No hemos determinado el origen exacto de la pérdida de masa muscular, que bien podría ser consecuencia de la combinación de desinervación y atrofia por desuso.

La sinaptofisina es una glicoproteína ácida abundante de la membrana de las vesículas sinápticas (Wiedenmann y Franke 1985) que es expresada por la mayoría de neuronas, células neuroendocrinas y células neoplásicas relacionadas con las neuronas (Navone y col. 1986). Se mueve por transporte axonal rápido, tanto retrógrada como anterógradamente (Dahlstrom y Li 1994), y su presencia se considera normalmente un indicador de la existencia de sinapsis (Guntinas-Lichius y col. 1994; Li y col. 2004). Trabajos previos han demostrado su eficacia para la detección de cambios sinápticos como consecuencia de la desinervación (Nacimiento y col. 1996) o de la axotomía (Tiraihi y Rezaie 2004) de neuronas en la ME y en el cerebro (Davis-López de Carrizosa y col. 2009). En nuestro trabajo hemos empleado la sinaptofisina para detectar y cuantificar cambios sinápticos en la MNs 3 días después de la axotomía de la neurona y en la sustancia gris de la ME después de 1 y 3 meses de una lesión por hemisección.

En este último los cambios en la intensidad de marcaje para sinaptofisina en el lado de lesión se analizaron con respecto a la del otro lado. Partiendo del supuesto de la existencia de simetría medular entre ambos lados de la ME, hemos establecido que cualquier diferencia de intensidad de marcaje para sinaptofisina será consecuencia directa de la lesión. Así, hemos detectado una pérdida sináptica en la zona perilesional 1 y 3 meses tras la hemisección. Estos resultados están en línea con trabajos previos realizados en las zonas craneales a una lesión medular, en los que se encontró una relación directa entre el grado de desinervación de las neuronas y su localización espacial desde la zona de lesión. Siendo significativamente más afectadas las más cercanas (1 - 2 mm), posiblemente por la interrupción de los axones propioespinales (Bernstein y Bernstein 1970). De forma significativa, nuestras observaciones indican que después de 3 meses de producirse la lesión, la zona perilesional permanece gravemente afectada por la pérdida sináptica. Posiblemente la desinervación masiva que sufren las neuronas en esta zona hace que no existan suficientes sistemas capaces de realizar neosinaptogénesis reactiva, contrario a lo que se observa en zonas medulares distantes de la lesión (Nacimiento y col. 1995). En soporte de esta interpretación, nuestros datos mostraron diferencias sinápticas significativas entre los grupos de 1 y 3 meses de lesión a una distancia de 2 mm caudal a la hemisección, con tendencia a la normalización de los valores en esta coordenada a los tres meses postlesión. El análisis del área de sustancia gris reactiva para sinaptofisina, de forma global y por regiones (dorsal, intermedia y ventral) mostró una marcada reducción en el lado lesionado respecto al sano, con mayor afectación de las regiones dorsal y ventral. En la reducción del área probablemente concurren fenómenos de desinervación y atrofia de las dendritas y somas de las neuronas segmentarias (Bjugn y col. 1997), sumados a la degeneración Walleriana de los axones seccionados.

#### **5.4 CAMBIOS RETRÓGRADOS TRAS AXOTOMÍA DE LAS MOTONEURONAS DEL TB**

Aunque la técnica de marcaje neuronal por axotomía ha sido una valiosa herramienta de trabajo para obtener el marcaje de múltiples grupos de MNs, no parece ser apropiada para realizar estudios más avanzados de desinervación y análisis de la conectividad de los subnúcleos de MNs. Inicialmente establecimos un periodo de 3 días como el tiempo

necesario para que el conjunto de los trazadores utilizados fuera transportado adecuadamente hasta el soma y produjeran un marcaje óptimo del mismo. Este tiempo fue suficiente para producir alteraciones en las entradas sinápticas a las MNs axotomizadas, indicando que los cambios sinápticos y metabólicos que aparecen a las pocas horas de producirse la axotomía (Li y col.2004) pueden conllevar una alteración rápida de la estructura sináptica.

En todas las muestras se han cuantificado dos parámetros: la intensidad y el grosor del halo de fluorescencia. Los valores medios obtenidos en ambos casos han sido muy similares mostrando que como consecuencia de la axotomía los terminales sinápticos se retraen o sufren cambios morfológicos que pueden medirse mediante microscopía confocal de muestras procesadas inmunohistoquímicamente, aún cuando la técnica de elección para realizar una correcta evaluación de este fenómeno debe ser la microscopía electrónica, que permite describir en forma detallada la degeneración y neoformación de las sinapsis por desinervación y por axotomía (Nacimiento y col. 1995; De La Cruz y col. 2000; Pastor y col. 2000).

## **5.5 NEURONAS PROPIOESPINALES CERVICALES QUE PROYECTAN A C7 EN LA RATA**

El trabajo preliminar relacionado con la inervación de C7 nos permitió establecer el tiempo de supervivencia necesario para obtener un marcaje óptimo de las estructuras de interés, información que nos será muy útil para el diseño de futuros experimentos.

Un resultado llamativo es la gran cantidad de neuronas desde los segmentos cervicales superiores que parecen proyectar a C7, que en número total representan una cifra parecida al total de neuronas marcadas en las estructuras encefálicas. Nuestros resultados muestran que la mayoría de las neuronas está en la lámina 7, de acuerdo con otros estudios sobre neuronas propioespinales (Jankowska 2001). Aunque la existencia de estas vías propioespinales es obvia, prácticamente no se han estudiado en la rata, y los detalles que se conocen son esencialmente electrofisiológicos en gatos y primates (Lundberg 1999). Por el contrario, si se ha descrito la importancia de las proyecciones reticuloespinales sobre la ME cervical y lumbar en rata (Holstege y Kuypers 1987; Alstermark y col. 2004; Reed y col. 2008), y también que existen numerosas neuronas propioespinales en los segmentos C1 y C2 que proyectan hasta los segmentos L5 – S1

(Miller y col. 1998), así como desde C4 – C6 hasta la ME lumbar (Zhang y col. 1996). Encontramos un patrón de distribución diferente entre las láminas 7 y 8 en el lado ipsilateral y contralateral a la inyección del trazador en C7, que demuestra una especificidad detallada en la conectividad propioespinal. Aunque se requieren estudios neuroanatómicos y electrofisiológicos más completos de estos circuitos, los datos apuntan a la existencia de un circuito premotoneuronal C3 – C4 en la rata, que podría funcionar como el del gato y primate, integrando las señales de numerosos sistemas antes de transmitir las a las MNs espinales.

## **5.6 CONSIDERACIONES METODOLÓGICAS ADICIONALES**

### **5.6.1 Técnicas de cuantificación de las MNs**

Debido a que los núcleos motores espinales están circunscritos a regiones pequeñas, hemos podido diseñar y comparar diferentes métodos de cuantificación de las MNs, que denominamos método absoluto, simple y estereológico. Con el método de cuantificación absoluto obtuvimos el número real de neuronas pero con gran inversión de tiempo y trabajo. Cuando el número de muestras y de neuronas a cuantificar es muy elevado, el método deja de ser práctico. Debemos restringir su uso a determinadas circunstancias, por ejemplo a la cuantificación de subnúcleos motores pequeños como el del fascículo lateral, pero no usarlo como técnica de rutina. Como alternativa de trabajo para obtener una cuantificación fiable que pueda ser utilizada de forma habitual proponemos la cuantificación simple que, aunque requiere del análisis y cuantificación de todo el tejido procesado, es mucho menos laborioso que el anterior. El mayor inconveniente es que puede sobrestimar el número real de perfiles neuronales por cuenta doble de la misma neurona en cortes consecutivos, principalmente de las neuronas de mayor tamaño. Las técnicas estereológicas ofrecen una forma objetiva, fiable y eficiente de obtener estimaciones no sesgadas de la cantidad de células en el sistema nervioso (Bermejo y col. 2003; Negredo y col. 2004). En este trabajo hemos aplicado los principios estereológicos del fraccionador óptico de una forma novedosa para cuantificar las MNs de subnúcleos motores específicos. Sin embargo, a pesar de nuestros mejores esfuerzos, no hemos conseguido obtener resultados mucho mejores



con esta técnica que con el método de contar simple, probablemente debido al pequeño tamaño y la estructura peculiar de las columnas de MNs.

### **5.6.2 Técnicas de trazado neuronal retrógrado**

El empleo de la técnica de triple trazado retrógrado por axotomía presenta ciertas ventajas. Por ejemplo, evita los problemas de difusión del trazador que se han visto tras inyecciones musculares (Haase y Hrycyshyn, 1985), proporciona información inequívoca sobre la posición relativa de los distintos subgrupos de neuronas del mismo núcleo motor, y disminuye el número de animales necesarios (Gordon y Richmond, 1990). La estructura molecular de los diferentes trazadores que utilizamos no influyó en el número o la localización de los subnúcleos motores del TB. Sin embargo, la técnica de trazado es muy invasiva y además produce cambios sinápticos asociados a la axotomía. En nuestras manos, la técnica de inyección intramuscular con AB también ha resultado muy eficiente, pudiendo ser rápida y muy poco invasiva, pero se encuentra muy limitada en el número de trazadores que se captan eficientemente en la unión neuromuscular. Actualmente existen alternativas prometedoras que pueden constituir una forma muy eficiente de estudiar los diferentes grupos de MNs espinales y su conectividad aferente sin lesionar el axón, como son los trazadores neurales de origen viral (Song y col. 2005; Jovanovic y col. 2010). Estos han supuesto un importante avance en los estudios neuroanatómicos permitiendo marcar específicamente circuitos neuronales enteros dentro de un mismo animal gracias a su capacidad de transporte transneuronal. Además, proporcionan un marcado más completo y homogéneo del complejo árbol dendrítico de las MNs. Sin embargo, aún no se ha investigado la existencia de alteraciones sinápticas por la carga viral de la neurona. Probablemente cada metodología de trazado sea de elección en aplicaciones concretas.

## **5.7 IMPLICACIONES EN EL ESTUDIO DE LA LESIÓN MEDULAR**

En humanos, aproximadamente dos tercios de las lesiones traumáticas de la ME ocurren a nivel cervical (Bunge y col. 1997) y causan trastornos permanentes, cuya severidad y modalidad dependen de la localización y extensión de la lesión. Los trastornos

funcionales observados en el miembro superior se deben a la muerte de neuronas y a la pérdida de entradas sinápticas en el segmento lesionado (Curt y Dietz 1996; Thomas y col. 1997; Collazos-Castro y col. 2005). Los avances médicos han aumentado la esperanza y calidad de vida de los pacientes con lesiones de la ME pero aun no existe un tratamiento específico de la misma. Un mejor conocimiento de los circuitos neuronales y la localización topográfica de las columnas motoras es una herramienta imprescindible para entender el origen de los déficits y los procesos homeostáticos que tienen lugar como respuesta a la lesión. Además, nos permitirá definir mejor las posibles estrategias terapéuticas que se pueden llevar a cabo en este tipo de pacientes aprovechando los circuitos residuales de grupos de MNs no afectadas. Nuestros resultados indican que lesiones en los segmentos cervicales C6, C7 o C8 producirán un daño específico sobre los diferentes subnúcleos motores del TB y en los circuitos propioespinales premotoneuronales. Si consideramos el TB como tres músculos independientes con propiedades biomecánicas específicas es posible que mejoremos la efectividad de los programas de rehabilitación y del diseño de los sistemas de electroestimulación para el miembro superior.

A pesar de la alta incidencia de lesiones cervicales en humanos, los modelos animales de lesión medular cervical aún son escasos (Schrimsher y Reier 1992; Collazos-Castro y col. 2005, Pearse y col. 2005; Anderson y col. 2007). Además de su utilidad clínica, estos modelos tienen un gran interés en la neurología restaurativa porque, al igual que en la médula lumbar, cada segmento cervical está funcionalmente relacionado con diferentes músculos del miembro anterior. La topografía de las MNs en las intumescencias de la médula cervical y lumbar tiene dos grandes consecuencias: 1) podremos diseñar modelos que lesionen selectivamente una columna de neuronas induciendo un daño motor específico; y 2) podremos evaluar con mayor facilidad y especificidad el impacto funcional de la regeneración axonal, ya que los axones que cruzan la lesión encontrarán directamente la diana en el segmento adyacente. De esta forma, los modelos cervicales de lesión medular como el que hemos desarrollado en C6 permitirán verificar los efectos de las intervenciones terapéuticas en su espectro anatómico, neurofisiológico y comportamental.

## *6. Conclusiones*

6.1 Los fascículos del TB en la rata reciben innervación independiente de 3 grupos neuronales organizados formando una única columna que se extiende entre los segmentos medulares C6 y T1 de forma asimétrica. Encontrándose entremezclados los tres tipos neuronales en la porción rostral y exclusivamente MNs que innervan al fascículo largo en la porción caudal.

6.2 Cada uno de los compartimentos musculares presenta características específicas en el tipo de fibras y tamaño medio de la unidad motora: El medial se compone de fibras musculares pequeñas y predominantemente de tipo 1 junto con unidades motoras pequeñas (69 fibras / MN). El fascículo lateral, en cambio, contiene fibras musculares de gran tamaño de tipo 2B y unidades motoras grandes (179 fibras / MN). Por último, la composición que presenta el fascículo largo es intermedia tanto para el tamaño de las fibras como de las unidades motoras (99 fibras / MN). Estas diferencias indican una importante especialización funcional de los fascículos, y hace que incluso pueda considerarse como músculos independientes.

6.3 Además, no hemos encontrado indicios de muerte transináptica en los grupos de MNs del TB después de una lesión medular por hemisección en C6, a pesar de la desinervación masiva que sufren estas neuronas. La desinervación que presenta el segmento se mantiene en el tiempo, al no restaurarse la densidad sináptica por procesos de sinaptogénesis reactiva como ocurre en otras regiones.

6.4 La inyección retrógrada de trazador en el segmento C7 ha demostrado que existe una población numerosa de neuronas propioespinales en los segmentos más craneales (C1 y C5) que proyecta a esta región, donde se localiza la mayor parte de las MNs que innervan el TB en la rata. Se han encontrado particularidades en cuanto a su localización a cada lado de la médula y es destacable concentración de proyecciones entre C3 y C4. Estos hallazgos demuestran la importancia del aporte aferente de neuronas propioespinales a esta zona y justifica la hipótesis de que la desinervación crónica tras la hemisección se debe a la interrupción de las vías propioespinales.

## *7. Bibliografía*

- Alstermark B., Lundberg A., Norrsell U., Sybirska E. (1981). Integration in descending motor pathways controlling the forelimb in the cat. 9. Differential behavioural defects after spinal cord lesions interrupting defined pathways from higher centres to motoneurons. *Exp Brain Res.* 42 (3-4): 299 - 318.
- Alstermark B., Lundberg A., Pettersson LG. (1991). The pathway from Ia forelimb afferents to the motor cortex: a new hypothesis. *Neurosci Res.* 11(3): 221 - 225.
- Alstermark B., Lundberg A., Pinter M., Sasaki S. (1987). Long C3-C5 propriospinal neurones in the cat. *Brain Res.* 404(1-2): 382 - 388.
- Alstermark B., Ogawa J., Isa T. (2004). Lack of monosynaptic corticomotoneuronal EPSPs in rats: disynaptic EPSPs mediated via reticulospinal neurons and polysynaptic EPSPs via segmental interneurons. *J Neurophysiol.* 91(4): 1832 - 1839.
- Anderson K.D., Gunawan A., Steward O. (2005). Quantitative assessment of forelimb motor function after cervical spinal cord injury in rats: relationship to the corticospinal tract. *Exp Neurol.* 194(1):161-74.
- Anderson K.D., Gunawan A., Steward O. (2007). Spinal pathways involved in the control of forelimb motor function in rats. *Exp Neurol.* 206(2):318-31.
- Aoki M., Fujito Y., Satomi H., Kurosawa Y., Kasaba T. (1986). The possible role of collateral sprouting in the functional restitution of corticospinal connections after spinal hemisection. *Neurosci Res.* (6): 617 - 627.
- Ariano M.A., Armstrong R.B., Edgerton V.R. (1973). Hindlimb muscle fiber populations of five mammals. *J histochem cytochem.* 21(1): 51 - 55.
- Bach - y - Rita P. (1980). Brain plasticity as a basis for therapeutic procedures. En: Bach - y - Rita P (Ed.): *Recovery of Function: Theoretical Considerations for Brain Injury Rehabilitation.* Hans, Huber, Bern SW & University Park Press Publs; New York, 225 - 263.
- Bach-y-Rita P. e Illis L.S. (1993). Spinal shock: possible role of receptor plasticity and non synaptic transmission. *Paraplegia.* 31(2): 82 - 87.
- Baldissera F., Cavallari P., Fournier E., Pierrot-Deseilligny E., Shindo M. (1987). Evidence for mutual inhibition of opposite Ia interneurons in the human upper limb. *Exp Brain Res.* 66(1): 106 - 114.
- Barany M. (1967). ATPase activity of myosin correlated with speed of muscle shortening. *J Gen Physiol.* 50: 197 - 216.

- Bareyre F.M., Kerschensteiner M., Raineteau O., Mettenleiter T.C., Weinmann O., Schwab M.E. (2004)** The injured spinal cord spontaneously forms a new intraspinal circuit in adult rats. *Nat Neurosci.* 7(3): 269 -77.
- Basbaum A.I., Clanton C.H., Fields H.L. (1978).**Three bulbospinal pathways from the rostral medulla of the cat: an autoradiographic study of pain modulating systems. *Comp Neurol.* 178(2): 209 - 224.
- Benítez-Temiño B., de la Cruz R.R., Tena J.J., Pastor A.M. (2005).**Cerebellar grafting in the oculomotor system as a model to study target influence on adult neurons. *Brain Res Brain Res Rev.* 49(2): 317- 329.
- Bermejo P.E., Jiménez C.E., Torres C.V., Avendaño C. (2003).** Quantitative stereological evaluation of the gracile and cuneate nuclei and their projection neurons in the rat. *J Comp Neurol.* 1;463(4): 419 - 433.
- Bernstein J.J., Bernstein M.E.. (19720).** Axonal regeneration and formation of synapses proximal to the site of lesion following hemisection of the rat spinal cord. *Exp Neurol* 30: 330 – 351.
- Binder M.D. y Mendell L.M. (1990).** The segmental motor system. Oxford University Press.
- Bjugn R., Nyengaard J. R., Rosland J. H. (1997).** Spinal cord transection- No loss of distal ventral horn neurons. *Exp Neurol.* 148, 179 - 186.
- Bodine S.C., Roy R.R., Eldred E., Edgerton V.R. (1987).** Maximal force as a function of anatomical features of motor units in the cat tibialis anterior. *J Neurophysiol.* 57(6): 1730 - 1745.
- Bondok A.A., Sansone F.M. (1984).** Quantitative ultrastructural stereology of synapses in nucleus dorsalis after a peripheral nerve injury at birth. *Exp Neurol.* 86(2): 331 - 341
- Bondok A.A., Sansone F.M.(1984).** Retrograde and transganglionic degeneration of sensory neurons after a peripheral nerve lesion at birth. *Exp Neurol.* 86(2): 322 – 330.
- Bortoff G.A. y Strick P.L. (1993).** Corticospinal terminations in two new-world primates: further evidence that corticomotoneuronal connections provide part of the neural substrate for manual dexterity. *J Neurosci.* 13(12): 5105 – 5118.

- Bose P., Parmer R., Reier P.J., Thompson F.J. (2005).** Morphological changes of the soleus motoneuron pool in chronic midthoracic contused rats. *Exp Neurol.* 191(1):13-23.
- Bottinelli R. y Reggiani C. (2000).** Human skeletal muscle fibres: molecular and functional diversity. *Prog Biophys Mol Biol* 73 (2-4): 195 - 262.
- Brooke M.H. y Kaiser K.K. (1970).** Muscle fiber types: how many and what kind? *Archives of Neurology.* 23: 369 – 379.
- Brown A.G. y Fyffe R.E. (1978).** The morphology of group Ia afferent fibre collaterals in the spinal cord of the cat. *J Physiol.* 274: 111 - 127.
- Brown A.G. y Fyffe R.E. (1978).** The morphology of Group Ib muscle afferent fibre collaterals. *J Physiol* 277: 44P - 45P.
- Brown-Séquard C.E. (1868).** Physiology and pathology of the nervous system; and on the treatment of organic nervous affections. *Lancet.* 2: 659 – 662.
- Bunge R., Puckett W. y Hiester E. (1997).** Observations on the pathology of several types of human spinal cord injury, with emphasis on the astrocyte response to penetrating injuries. *Adv. Neurol.* 72: 305 – 315.
- Burke R.E. y Tsairis P. (1973).** Anatomy and innervation ratios in motor units of cat gastrocnemius. *J physiol* 234: 749 - 765.
- Burke R.E. y Tsairis P. (1973).** Anatomy and innervation ratios in motor units of cat gastrocnemius. *J Physiol.* 234(3): 749 - 765.
- Burke R.E., Levine D.N., Tsairis P., Zajac F.E. (1973).** Physiological types and histochemical profiles in motor units of the cat gastrocnemius. *J Physiol* 234: 723 - 748.
- Button D.C., Kalmar J.M., Gardiner K., Marqueste T., Zhong H., Roy R.R., Edgerton V.R., Gardiner PF. (2008).** Does elimination of afferent input modify the changes in rat motoneurone properties that occur following chronic spinal cord transection? *J Physiol.* 586(2): 529 - 544.
- Caceres A. y Steward O. (1983).** Dendritic reorganization in the denervated dentate gyrus of the rat following entorhinal cortical lesions: a Golgi and electron microscopic analysis, *J. Comp. Neurol.* 136: 287 – 295.
- Carroll A.M, Lee D.V., Biewener A.A. (2008).** Differential muscle function between muscle synergist: long and lateral heads of the triceps in jumping and landing goats (*Capra hircus*). *J Appl Physiol.* 105: 1262 - 1273.



- Carroll A.M., Biewener A. A. (2009). Mono- versus biarticular muscle function in relation to speed and gait changes: in vivo analysis of the goat triceps brachii. *J Exp Biol.* 212(Pt 20): 3349 - 3360.
- Carson K.A. y Mesulam M.M. (1982). Electron microscopic demonstration of neural connections using horseradish peroxidase: a comparison of the tetramethylbenzidine procedure with seven other histochemical methods. *J histochem cytochem.* 30: 425 - 435.
- Chanaud C.M., Pratt C.A., Loeb G.E. (1991). Functionally complex muscles of the cat hindlimb. II. Mechanical and architectural heterogeneity within the biceps femoris. *Exp Brain Res.* 85(2): 257 - 270.
- Chang C.W. (1998). Evident transsynaptic degeneration of motor neurons after spinal cord injury: a study of neuromuscular jitter by axonal microstimulation.. *Am J Phys Med Rehabil.* 77(2):118-21.
- Chen J.R., Tseng G.F. (1997). Membrane properties and inhibitory connections of normal and upper cervically axotomized rubrospinal neurons in the rat. *Neuroscience.* Jul;79(2): 449 – 462
- Chen X.Y. y Wolpaw J.R. (1994). Triceps surae motoneuron morphology in the rat: a quantitative light microscopic study. *J comp neurol.* 343: 143 - 157.
- Chiken S., Hatanaka N., Tokuno H. (2001). Distribution of median, ulnar and radial motoneurons in the monkey spinal cord: a retrograde triple-labeling study. *Neurosci Letters.* 307: 143 - 146.
- Clark F.M. y Proudfit H.K. (1991). The projection of locus coeruleus neurons to the spinal cord in the rat determined by anterograde tracing combined with immunocytochemistry. *Brain Res.* 538(2): 231 - 245.
- Climent S. y Bascuas J.A. (1989). Cuadernos de anatomía y embriología veterinaria. Editorial Marban.
- Cohen A.H. y Gans C. (1975). Muscle activity in rat locomotion: movement analysis and electromyography of the flexors and extensors of the elbow. *J Morphol.* 46 (2): 177 - 196.
- Cohen L.A. (1953). Localization of stretch reflex. *J Neurophysiol.* 16; 272 - 285.
- Collazos-Castro J.E., Nieto-Sampedro M. (2001). Developmental and reactive growth of dentate gyrus afferents: cellular and molecular interactions. *Restor Neurol Neurosci.* 19(3-4): 169 - 187.

- Collazos-Castro J.E., Soto V.M., Gutierrez-Davila M, Nieto-Sampedro M. (2005). Motoneuron loss associated with chronic locomotion impairments after spinal cord contusion. *J Neurotrauma* 22: 544 - 558.
- Cope T.C., Sokoloff A.J. (1999). Orderly recruitment among motoneurons supplying different muscles. *J physiol* 93: 81 - 85.
- Courtine G., Song B., Roy R.R., Zhong H., Herrmann J.E., Ao Y., Qi J., Edgerton V.R., Sofroniew M.V. (2008). Recovery of supraspinal control of stepping via indirect propriospinal relay connections after spinal cord injury. *Nat Med.* 14(1): 69 - 74.
- Crockett D.P. y Harris S.L., Egger M.D. (1987). Plantar motoneuron columns in the rat. *J Comp Neurol.* 265(1): 109 – 118.
- Cullheim S. y Kellerth J.O. (1978). A morphological study of the axons and recurrent axon collaterals of cat alpha-motoneurons supplying different hind-limb muscles. *J Physiol.* 281: 285 - 299.
- Curt A., Dietz V. (1996). Neurographic assessment of intramedullary motoneurone lesions in cervical spinal cord injury: consequences for hand function. *.Spinal Cord.* 34(6): 326 - 332.
- Dahlström A.B. y Li J.Y. (1994). Fast and slow axonal transport-different methodological approaches give complementary information: contributions of the stop-flow/crush approach. *Neurochem Res.* 19(11): 1413 - 1419.
- Darian-Smith C. (2009). Synaptic plasticity, neurogenesis, and functional recovery after spinal cord injury. *Neuroscientist.* 15 (2): 149 - 165.
- d'Avella A., Portone A., Fernandez L., Lacquaniti F.( 2006). Control of fast-reaching movements by muscle synergy combinations. *J Neurosci.* 26(30): 7791 - 7810.
- Davis-López de Carrizosa M.A., Morado-Díaz C.J., Tena J.J., Benítez-Temiño B., Pecero M.L., Morcuende S.R., de la Cruz R.R., Pastor A.M..(2009). Complementary actions of BDNF and neurotrophin-3 on the firing patterns and synaptic composition of motoneuronas. *J Neurosci.* 29(2): 575 - 587.
- Davis-López de Carrizosa MA, Morado-Díaz CJ, Morcuende S, de la Cruz RR, Pastor AMJ *Neurosci.* (2010 ). Nerve growth factor regulates the firing patterns and synaptic composition of motoneurons. *Neurosci.* 16;30(24) :8308 – 8319.
- De La Cruz R.R., Delgado-García J.M., Pastor A.M. (2000). Discharge characteristics of axotomized abducens internuclear neurons in the adult cat. *J Comp Neurol.* 427(3): 391 - 404.

- Deitch J.S., Rubel E.W. (1989). Rapid changes in ultrastructure during deafferentation-induced dendritic atrophy *J Comp Neurol.* 281(2): 234 - 258..
- Donevan A.H., Neuber-Hess M., Rose P.K. (1990). Multiplicity of vestibulospinal projections to the upper cervical spinal cord of the cat: a study with the anterograde tracer *Phaseolus vulgaris* leucoagglutinin. *J Comp Neurol.* 302(1): 1 - 14.
- Dorph-Petersen K.A., Nyengaard J.R., Gundersen H.J. Tissue shrinkage and unbiased stereological estimation of particle number and size. *J Microsc.* 204(Pt 3):232-4
- Dyce K.M., Sack W.O., Wensing C.J.G. (1999). *Anatomía veterinaria*, McGraw-Hill Interamericana.
- Eccles J.C, Sherrington C.S .(1930). Reflex summation in the ipsilateral spinal flexion reflex. *J Physiol.* 69(1): 1 - 28.
- Eccles J.C., Eccles R.M., Lundberg A. (1958). The action potentials of the alpha motoneurons supplying fast and slow muscles. *J Physiol.* 142(2): 275 - 291.
- Eccles J.C., Libet B., Young R.R. (1958). The behaviour of chromatolysed motoneurons studied by intracellular recording. *J Physiol.* 143(1): 11 - 40.
- Edgerton V.R., McCall G.E., Hodgson J.A., Gotto J., Goulet C., Fleischmann K, Roy R.R. (2001) Sensorimotor adaptations to microgravity in humans. *J Exp Biol.* 204(Pt 18): 3217 - 3224.
- Edström L. y Kugelberg E. (1968). Histochemical composition, distribution of fibres and fatiguability of single motor units. *J Neurol Neurosurg Psychiat* 31: 424 - 433.
- Eidelberg E., Nguyen L. H., Polich R., Walden J. G. (1989) Transsynaptic degeneration of motoneurons caudal to spinal cord lesions. *Brain Research Bulletin*, Vol. 22, pp 39-45.
- Elder G.C., Bradbury K., Roberts R. (1982). Variability of fiber type distributions within human muscles. *J Appl Physiol.* 53(6): 1473 - 1480.
- Ellenberger H.H., Feldman J.L., Goshgarian H.G. (1990). Ventral respiratory group projections to phrenic motoneurons: electron microscopic evidence for monosynaptic connections. *J Comp Neurol.* 302(4): 707 - 714.
- Engberg I. y Lundberg A. (1969). An electromyographic analysis of muscular activity in the hindlimb of the cat during unrestrained locomotion. *Acta Physiol Scand.* 75(4): 614 - 630.
- English A.W. y Letbetter W.D. (1982). Anatomy and innervation patterns of cat lateral gastrocnemius and plantaris muscles. *A J Anat.* 164: 67 - 77.

- English A.W., Wolf S.L., Segal R.L. (1993). Compartmentalization of Muscles and Their Motor Nuclei: The Partitioning Hypothesis. *Physical Therapy*. 12: 857 - 867.
- Enoka R.M., Fuglevand A.J. (2001). Motor unit physiology: some unresolved issues. *Muscle & Nerve*. 24: 4 - 17.
- Evans H.E. y deLahunta A. (1996) Miller's guide to the dissection of the dog. W.B Saunders Company, Philadelphia, Pennsylvania.
- Fabricio P.A. y Clemente F.R. (1997). Variation in the triceps brachii muscle: a fourth muscular head. *Clin Anat*. 10(4); 259 - 263.
- Fischer M.S. (1999). Kinematics, EMG, and Inverse Dynamics of the Terrina Forilimb-a Synthetic Approach. *Zool. Anz*. 238: 41 - 54.
- Fischer M.S. y Blickhan R. (2006). The tri-segmented limbs of therian mammals: kinematics, dynamics, and self-stabilization--a review. *J Exp Zool A Comp Exp Biol*. 305(11): 935 - 952.
- Fischer M.S., Schilling N., Schmidt M., Haarhaus D., Witte H. (2002). Basic limb kinematics of small therian mammals. *J Exp Biol*. 205: 1315 – 1338.
- Fouad K, Dietz V, Schwab ME. (2001). Improving axonal growth and functional recovery after experimental spinal cord injury by neutralizing myelin associated inhibitors. *Brain Res Brain Res Rev*. 36(2-3): 204 - 212.
- Fouad K., Pedersen V., Schwab M.E., Brösamle C. (2001). Cervical sprouting of corticospinal fibers after thoracic spinal cord injury accompanies shifts in evoked motor responses. *Curr Biol*. 11(22): 1766 - 1770.
- Friese A., Kaltschmidt J.A., Ladle D.R., Sigrist M., Jessell T.M., Arber S. (2009). Gamma and alpha motor neurons distinguished by expression of transcription factor *Err3*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 106(32): 13588 - 13593.
- Fuentes I., Cobos A.R., Segade L.A. (1998). Muscle fibre types and their distribution in the biceps and triceps brachii of the rat and rabbit. *J Anat* 192: 203 – 210.
- Fujito Y. y Aoki M. (1995). Monosynaptic rubrospinal projections to distal forelimb motoneurons in the cat. *Exp Brain Res*. 105(2): 181 - 190.
- Fyffe R.E. (1991). Spatial distribution of recurrent inhibitory synapses on spinal motoneurons in the cat. *J Neurophysiol*. 65(5): 1134 – 1149.
- Gatesy S.M., English A.W. (1993). Evidence for compartmental identity in the development of the rat lateral gastrocnemius muscle. *Develop dynamics*. 196: 174-182.

- Gauthier G.F. (1969). On the relationship of ultrastructural and cytochemical features of color in mammalian skeletal muscle. *Z Zellforsch Mikrosk Anat.* 95(3): 462 – 482.
- George R., Griffin J.W. (1994). The proximo-distal spread of axonal degeneration in the dorsal columns of the rat. *J Neurocytol.* 1994 Nov;23(11): 657 - 667.
- Ghosh A, Sydekum E, Haiss F, Peduzzi S, Zörner B, Schneider R, Baltes C, Rudin M, Weber B, Schwab ME. (2009). Functional and anatomical reorganization of the sensory-motor cortex after incomplete spinal cord injury in adult rats. *J Neurosci* Sep 30;29(39): 12210 - 12219.
- Ginsberg S.D., Martin L.J. (2002). Axonal transection in adult rat brain induces transsynaptic apoptosis and persistent atrophy of target neurons. *J Neurotrauma.* Jan;19(1): 99 - 109
- Gonyea W.J. y Ericson G.C. (1977). Morphological and histochemical organization of the flexor carpi radialis muscle in the cat. *Am J Anat.* 148(3): 329 – 344.
- Gorb S.N. y Fischer M.S. (2000). Three-dimensional analysis of the arrangement and length distribution of fascicles in the triceps muscle of *Galea musteloides* (Rodentia, Cavimorpha). *Zoomorphology.* 120: 91 - 97.
- Gordon D.C. y Richmond F.J.R. (1990). Topography in the phrenic motoneuron nucleos demonstrated by retrograde multiple-labelling techniques. *J comp neurol.* 292: 424 - 434.
- Gordon D.C., Loeb G.E., Richmond F.J.R. (1991). Distribution of motoneurons supplying cat sartorius and tensor fasciae latae, demonstrated by retrograde multiple-labelling methods. *J comp neurol.* 304: 357 - 372.
- Gramsbergen A. (2005). Postural control in man: the phylogenetic perspective. *Neural Plast* 12 (2-3): 77 - 88; discussion 263 - 72.
- Gramsbergen A., Ijkema-Paassen J., Westerga J., Geisler H.C. (1996). Dendrite bundles in motoneuronal pools of trunk and extremity muscles in the rat. *Exp Neurol.* 137(1): 34 - 42
- Green H.J., Reichmann H., Pette D. (1982). A comparison of two ATPase based schemes for histochemical muscle fibre typing in various mammals. *Histochem* 76: 21 – 31
- Grillner S., Wallén P., Brodin L., Lansner A. (1991). Neuronal network generating locomotor behavior in lamprey: circuitry, transmitters, membrane properties, and simulation. *Annu Rev Neurosci.* 14: 169 – 199.

- Gruionu G., Constantinescu G.M., Laughlin M.H. (2000). An anatomical study of the arteries feeding the Triceps brachii muscle of swine. *Anat. Histol. Embryol.* 29: 31-36.
- Guntinas-Lichius O., Neiss W.F., Gunkel A., Stennert E. (1994). Differences in glial, synaptic and motoneuron responses in the facial nucleus of the rat brainstem following facial nerve resection and nerve suture reanastomosis. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 251(7):410-7.
- Guth L. y Samaha F.J. (1970). Procedure for the histochemical demonstration of actomyosin ATPase. *Exp Neurol.* 28(2): 365 - 367.
- Haase P., Hryciyshyn A.W. (1985). Labeling of motoneurons supplying the cutaneous maximus muscle in the rat, following injection of the triceps brachii muscle with horseradish peroxidase. *Neurosci Letter* 60(3): 313 - 318.
- Hama A. T., Pappas G. D., Sagen J. (1996) Adrenal medullary implants reduce transsynaptic degeneration in the spinal cord of rats following chronic constriction nerve injury. *Exp Neurol.* 137: 81 - 93.
- Harridge S.D.R., Bottinelli R., Canepari M., Pellegrino M.A., Reggiani C., Esbjörnsson M., Saltin B. 1996. Whole-muscle and single-fibre contractile properties and myosin heavy chain isoforms in human. *Pflügers Arch- Eur J Physiol.* 432: 913 – 920.
- Hart CB, Giszter SF. (2004). Modular premotor drives and unit bursts as primitives for frog motor behaviours. *J Neurosci.* ;24(22): 5269 - 5282.
- Hauschka E.O., Roy R.R., Edgerton V.R. (1987). Size and metabolic properties of single muscle fibers in rat soleus after hindlimb suspension. *J Appl Physiol.* 62 (6): 2338 - 2347.
- He Z.H., Bottinelli R., Pellegrino M.A., Ferenczi M.A., Reggiani C. (2000). ATP consumption and efficiency of human single muscle fibers with different myosin isoform composition. *Biophys J* 79 (2): 945 - 961.
- Hebel R., Stromberg M.W. (1976) *Anatomy of the laboratory rat.* The Williams & Wilkins company, Baltimore.
- Heimer L, Kalil R. (1978). Rapid transneuronal degeneration and death of cortical neurons following removal of the olfactory bulb in adult rats. *J Comp Neurol.* Apr 1;178(3): 559 - 609
- Henneman E. (1957). Relation between size of neurons and their susceptibility to discharge. *Science* 126: 1345 - 1347.

- Henneman E.** (1985). The size-principle: A deterministic output emerges from a set of probabilistic connections. *J. exp. Biol.* 115: 105-112.
- Henneman E., Somjen G., Carpenter D.O.** (1965). Functional significance of cell size in spinal motoneurons. *J Neurophysiol.* 28: 560 - 580.
- Hermann G.W.** 1962. An electromyographic study of selected muscles involved in the shot put. *Res Q* 33: 85 - 93.
- Hiersemenzel L-P., Curt A. y Dietz V.** (2000). From spinal shock to spasticity. Neuronal adaptations to a spinal cord injury. *Neurology* 54: 1574 – 1582.
- Hintz C.S., Coyle E..F, Kaiser K.K., Chi M.M.Y., Lowry O.H.** (1984). Comparison of muscle fiber typing by quantitative enzyme assay and myosin ATPase staining. *J Histochem Cytochem.* 32(6): 655 - 660.
- Hoffer J.A., Loeb G.E., Sugano N., Marks W.B., O'Donovan M.J., Pratt C.A.** (1987). Cat hindlimb motoneurons during locomotion. III. Functional segregation in Sartorius. *J Neurophysiol.* 57(2): 554 - 562.
- Holstege G.** (1989). Anatomical study of the final common pathway for vocalization in the cat. *J Comp Neurol.* 284(2): 242 – 252.
- Holstege J.C.** (1991). Ultrastructural evidence for GABAergic brain stem projections to spinal motoneurons in the rat. *J Neurosci.* 11(1): 159 – 167.
- Holstege J.C., Kuypers H.G.** (1987). Brainstem projections to spinal motoneurons: an update. *Neuroscience.* ;23(3):809-21. ;
- Horák V.** (1983). A successive histochemical staining for succinate dehydrogenase and "reversed"-ATPase in a single section for the skeletal muscle fibre typing .*Histochemistry.* 78(4): 545 - 553.
- Hunter J. y Ashby P.** (1984). Secondary changes in segmental neurons below a spinal cord lesion in man. *Arch Phys Med Rehabil.* Nov;65(11):702-5.
- Ijkema-Paassen J., Gramsbergen A.** (2005). Development of postural muscles and their innervation. *Neural Plast.* 12(2-3): 141 – 151.
- Ishihara A., Ohira Y., Tanaka M., Nishikawa W., Ishioka N., Higashibata A., Izumi R., Shimazu T., Iyata Y.** (2001). Cell body size and succinate dehydrogenase activity of spinal motoneurons innervating the soleus muscle in mice, rats, and cats. *Neurochem Res.* 26(12): 1301 – 1304.

- Ishihara A., Taguchi S., Araki H., Nishihira Y. (1991). Retrograde neuronal labeling of motoneurons in the rat by fluorescent tracers, and quantitative analysis of oxidative enzyme activity in labeled neurons. *Neuroscience Letters*, 124: 141-143.
- Ishihara A., Yamashiro J., Matsumoto A., Higashibata A., Ishioka N., Shimazu T., Ohira Y. (2006). Comparison of cell body size and oxidative enzyme activity in motoneurons between the cervical and lumbar segments in the rat spinal cord after spaceflight and recovery. *Neurochem Res.* 31(3): 411 - 415.
- Iwaniuk AN, Whishaw IQ.(2000). On the origin of skilled forelimb movements. *Trends Neurosci.* 23(8): 372 - 376.
- James R., Wiggins-James N., hompson G. (2005). AS PE for AQA. Heinemann Educational Publishers
- Jankowska E. (2001).Spinal interneuronal systems: identification, multifunctional character and reconfigurations in mammals. *J Physiol.* 533(Pt 1): 31 - 40.
- Jenny A.B., Inukai J. (1983). Principles of motor organization of the monkey cervical spinal cord. *The Journal of Neuroscience*, vol 3, 3:567-575.
- Johnson M.A., Sideri G., Weightman D., Appleton D. (1973). A comparison of fibre size, fibre type constitution and spatial fibre type distribution in normal human muscle and in muscle from cases of spinal muscular atrophy and from other neuromuscular disorders. *J Neurol Sci.* 20(4): 345 - 361.
- Jovanovic K., Pastor A.M., O'Donovan M.J. (2010). The use of PRV-Bartha to define premotor inputs to lumbar motoneurons in the neonatal spinal cord of the mouse. *PLoS One.* 23;5(7): e11743.
- Kadhiresan V.A., Hassett C.A., Faulkner J.A. (1996). Properties of single motor units in medial gastrocnemius muscles of adult and old rats. *J Physiol.* 493( Pt 2): 543 - 552.
- Kaelan C., Jacobsen P.F., Kakulas B.A. (1988). An investigation of possible transynaptic neuronal degeneration in human spinal cord injury. *J Neurol Sci.* Sep;86 (2-3): 231 - 237.
- Kanda K., Hashizume K. (1992). Factors causing difference in force output among motor units in the rat medial gastrocnemius muscle. *J Physiol* 448:677-695
- Kanning K.C., Kaplan A., Henderson C.E. (2010). Motor neuron diversity in development and disease. *Annu Rev Neurosci.* 33: 409 - 440.
- Karp JR.(2001). Muscle fiber types and training. *Track coach* 155.



- Kashihara Y, Kuno M, Miyata Y. (1987).** Cell death of axotomized motoneurons in neonatal rats, and its prevention by peripheral reinnervation. *J Physiol.* May;386: 135 - 148.
- Keen D.A., Fuglevand A.J. (2004).** Common input to motor neurons innervating the same and different compartments of the human extensor digitorum muscle. *J Neurophysiol* 91: 57 - 62.
- Kernell D. (1998).** Muscle regionalization. *Can J Appl Physiol* 23 (1): 1 - 22.
- Kernell D.(1986).** Organization and properties of spinal motoneurons and motor units. *Prog Brain Res.* 1986;64:21-30. Review. .
- Kirshblum S.C. y O'Connor K.C. (1998).** Predicting neurologic recovery in traumatic cervical spinal cord injury. *Arch Phys Med Rehabil.* 79(11):1456 - 1466.
- Krogh J.E., Towns L.C. (1985).** Is there morphological separation between the spinal
- Krogh J.E., Towns L.C. (1986).** Is there morphological separation between the spinal cord motor nuclei which innervate the heads of a multiheaded muscle? *Brain Res.* 26;369 (1-2): 331 - 335.
- Lazarides E. (1980).** Intermediate filaments as mechanical integrators of cellular space. *Nature* 283: 249-256,
- Lemon R.N., Griffiths J. (2005).** Comparing the function of the corticospinal system in different species: organizational differences for motor specialization? *Muscle Nerve.* 32 (3): 261 - 279.
- Lexell J., Jarvis J.C., Currie J., Downham, Salmons S. 1994.** Fibre type composition of rabbit tibialis anterior and extensor digitorum longus muscles. *J. Anat.* 185: 95 - 101.
- Li G.L., Farooque M., Isaksson J., Olsson Y. (2004).** Changes in synapses and axons demonstrated by synaptophysin immunohistochemistry following spinal cord compression trauma in the rat and mouse. *Biomed Environ Sci.* Sep;17(3):281-90.
- Lieber R. (2002)** Skeletal muscle structure, function and plasticity. Lippincott Williams & Wilkins.
- Little J.W., Ditunno J.F. Jr, Stiens S.A., Harris RM. (1999),** Incomplete spinal cord injury: neuronal mechanisms of motor recovery and hyperreflexia. *Arch Phys Med Rehabil.* 80(5): 587 - 599.
- Loeb G.E., Marks W.B., Hoffer J.A. (1987).** Cat hindlimb motoneurons during locomotion. IV. Participation in cutaneous reflexes. *J Neurophysiol.* 57(2): 563 - 573.

- López-Dolado, Lucas-Osma y Collazos-Castro 2011 Dissociated forelimb deficits and adaptations after cervical spinal cord injury artículo en preparación). “
- Lucas-Osma AM, Collazos-Castro JE. (2009). Compartmentalization in the triceps brachii motoneuron nucleus and its relation to muscle architecture. *J Comp Neurol*. 516(3): 226 - 239.
- Lundberg A. (1999). Descending control of forelimb movements in the cat. *Brain Res Bull*. 50(5-6): 323 - 324.
- Matsumoto A., Nagatomo F., Mori A., Ohira Y., Ishihara A. (2007). Cell size and oxidative enzyme activity of rat biceps brachii and triceps brachii muscles. *J Physiol Sci*. Oct; 57(5): 311 - 319.
- Matthews D.A., Cotman C., Lynch G. (1976). An electron microscopic study of lesion-induced synaptogenesis in the dentate gyrus of the adult rat. I. Magnitude and time course of degeneration. *Brain Res*. Oct 8;115(1): 1 - 21.
- Matthews M.R., Cowan W.M., Powell T.P. (1960). Transneuronal cell degeneration in the lateral geniculate nucleus of the macaque monkey. *J Anat*. Apr;94(Pt 2):145-69.
- Matthews M.R., Powell T.P. (1962). Some observations on transneuronal cell degeneration in the olfactory bulb of the rabbit. *Anat*. 1962 Jan;96: 89 - 102.
- Matthews MR, Nelson VH. (1975). Detachment of structurally intact nerve endings from chromatolytic neurones of rat superior cervical ganglion during the depression of synaptic transmission induced by post-ganglionic axotomy. *J Physiol*. 245(1): 91 - 135.
- McBride R. L., Feringa E. R. (1991) Ventral horn motoneurons 10, 20 and 52 weeks after T-9 spinal cord transection. *Brain Research Bulletin*, Vol. 28, pp. 57-60.
- McComas AJ. (1995). Motor unit estimation: anxieties and achievements. *Muscle Nerve*. 1995 Apr;18(4): 369 - 379.
- McHanwell S., Biscoe T.J. (1981). The localization of motoneurons supplying the hindlimb muscles of the mouse. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 293(1069): 477 - 508.
- McKenna J.E., Prusky G.T., Whishaw I.Q. (2000). Cervical Motoneuron Topography Reflects the Proximodistal Organization of Muscles and Movements of the Rat Forelimb; A Retrograde Carbocyanine Dye Analysis. *The Journal of Comparative Neurology* 419: 286 - 296.

- McKiernan B.J., Marcario J.K., Karrer J.H, Cheney P.D. (1998). Corticomotoneuronal postspike effects in shoulder, elbow, wrist, digit, and intrinsic hand muscles during a reach and prehension task. *J Neurophysiol.* 1998 Oct;80(4): 196 1- 1980.
- Mendell L.M. (2005). The size principle: a rule describing the recruitment of motoneurons. *J Neurophysiol* 93: 3024 - 3026.
- Mendell L.M., Henneman E. (1971). Terminals of single Ia fibers: location, density, and distribution within a pool of 300 homonymous motoneurons. *J Neurophysiol* 34(1): 171 - 187.
- Mendell L.M., Collins W.F. 3rd, Munson JB. (1994). Retrograde determination of motoneuron properties and their synaptic input. *J Neurobiol.* 1994 Jun;25(6): 707 - 721.
- Mesulam M. M. (1978) Tetramethyl Benzidine for Horseradish peroxidase neurohistochemistry: A non - carcinogenic blue reaction product with superior sensitivity for visualizing neural afferents and efferents. *J. Histochem Cytochem*, 26: 106 - 117.
- Miller S. y van der Meché F.G.A. (1975) Movements of the forelimbs of the cat during stepping on a treadmill. *Brain Research* Volume 91, Issue 2, 27 June 1975, Pages 255 – 269.
- Molander C., Xu Q., Rivero-Melian C., Grant G. (1989). Cytoarchitectonic organization of the spinal cord in the rat: II. The cervical and upper thoracic cord. *J. Comp. Neurol.* 289: 375 - 385.
- Moritani T., deVries H.A. (1979), Neural factors versus hypertrophy in the time course of muscle strength gain. *Am J Phys Med.* 1979 Jun;58(3): 115 - 130.
- Nacimient W. Brook G. y Noth J. (1997). Lesion-induced neuronal reorganization in the spinal cord: morphological aspects. *Adv. Neurol.* 73: 37 – 59.
- Nacimient W., Noth J. (1999). What, if anything, is spinal shock?. *Arch. Neurol.* 56: 1033 – 1035.
- Nacimient W., Sappok T., Brook G., Tóth L., Oestreicher A., Gispen W., Noth J., Kreutzberg G. (1995a). B-50 (GAP-43) in the rat spinal cord caudal to hemisection: lack of intraspinal sprouting by dorsal root axons. *Neurosci. Lett.* 194: 13 – 16.
- Nacimient W., Sappok T., Brook G., Tóth L., Schoen S., Noth J., Kreutzberg G. (1995b). Structural changes of anterior horn neurons and their synaptic input caudal to a low thoracic spinal cord hemisection in the adult rat: a light and electron microscopic study. *Acta Neuropathol.* 90: 552 – 564.

- Nacimiento W., Schlözer B., Brook G.A, Tóth L., Töpper R., Noth J., Kreutzberg G.W. (1996). Transient decrease of acetylcholinesterase in ventral horn neurons caudal to a low thoracic spinal cord hemisection in the adult rat. *Brain Res.* 1;714(1-2):177-84.
- Nakajima K, Maier MA, Kirkwood PA, Lemon RN. (2000). Striking differences in transmission of corticospinal excitation to upper limb motoneurons in two primate species. *J Neurophysiol* 84 (2): 698 - 709.
- Nardone A, Romano C, Schieppati M. 1989. Selective recruitment of high-threshold human motor units during voluntary isotonic lengthening of active muscles. *J physiol* 409: 451-471.
- Navone F., Jahn R., Di Gioia G., Stukenbrok H., Greengard P., De Camilli P. (1986). Protein p38: an integral membrane protein specific for small vesicles of neurons and neuroendocrine cells. *J Cell Biol.* 1986 Dec;103(6 Pt 1): 2511 - 2527.
- Negredo P., Castro J., Lago N., Navarro X., Avendaño C. (2004). Differential growth of axons from sensory and motor neurons through a regenerative electrode: a stereological, retrograde tracer, and functional study in the rat. *Neuroscience.* 128(3): 605 - 615.
- Nelson S. y Mendell L. (1979). Enhancement in Ia-motoneuron synaptic transmission caudal to chronic spinal cord transection. *J. Neurophysiol.* 42: 642 – 654.
- Nemeth P.M., Pette D. (1980). The interrelationship of two systems of fiber classification in rat EDL muscle. *J Histochem Cytochem* 28 (2): 193.
- Nicolopoulos-Stournaras S., Iles J.F. (1983). Motor neuron columns in the lumbar spinal cord of the rat. *J Comp Neurol* 217: 75-85.
- Nieto-Sampedro M, Collazos-Castro JE, Taylor JS, Gudiño-Cabrera G, Verdú-Navarro E, Pascual-Piédrola JJ, Insausti-Serrano R. (2002). Traumatic injuries to the central nervous system and their repair]. *Rev Neurol.* 16-30;35(6):534-52
- Nieto-Sampedro M. (1999). Neurite outgrowth inhibitors in gliotic tissue. *Adv. Exp. Med. Biol.* 468: 207 – 224.
- Oliveira AL, Thams S, Lidman O, Piehl F, Hökfelt T, Kärre K, Lindå H, Cullheim S. (2004). A role for MHC class I molecules in synaptic plasticity and regeneration of neurons after axotomy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Dec 21;101(51): 17843 - 17848.
- Ornung G., Ottersen O.P., Cullheim S., Ulfhake B. (1998). Distribution of glutamate-, glycine- and GABA-immunoreactive nerve terminals on dendrites in the cat spinal motor nucleus. *Exp Brain Res.* 1998 Feb;118(4): 517 - 532.

- Ornung G., Ragnarson B., Grant G., Ottersen O.P., Storm-Mathisen J., Ulfhake B. (1995). Ia boutons to CCN neurones and motoneurones are enriched with glutamate-like immunoreactivity. *Neuroreport*. 1995 Oct 23;6(15):1975-80.
- Pakkenberg B., Gundersen H.J. (1988). Total number of neurons and glial cells in human brain nuclei estimated by the disector and the fractionator. *J Microsc*. 1988 Apr;150(Pt 1):1-20.
- Paré E.B., Stern J.T. Jr, Schwartz JM. (1981). Functional differentiation within the tensor fasciae latae. A telemetered electromyographic analysis of its locomotor roles. *J Bone Joint Surg Am*. 1981 Dec;63(9): 1457 - 1471.
- Pastor A.M., González-Forero D. (2003). Recruitment order of cat abducens motoneurons and internuclear neurons. *J Neurophysiol* 90: 2240 - 2252.
- Pastor AM, Delgado-García JM, Martínez-Guijarro FJ, López-García C, de La Cruz RR. (2000). Response of abducens internuclear neurons to axotomy in the adult cat. *J Comp Neurol*. 2000 Nov 20;427(3): 370 - 390.
- Pauvert V., Pierrot-Deseilligny E., Rothwell J.C. (1998). Role of spinal premotoneurons in mediating corticospinal input to forearm motoneurons in man. *J Physiol*. 508 ( Pt 1): 301 - 312.
- Paxinos G. y Watson C. (2005). *The rat brain in stereotaxic coordinates*. Elsevier Academic
- Pearse D.D., Lo T.P. Jr, Cho K.S., Lynch M.P., Garg M.S., Marcillo A.E., Sanchez A.R., Cruz Y., Dietrich W.D. (2005). Histopathological and behavioral characterization of a novel cervical spinal cord displacement contusion injury in the rat. *Neurotrauma*. 22(6): 680 - 702.
- Peter J.B., Barnard R.J., Edgerton V.R., Gillespie C.A., Stempel K.E. (1972). Metabolic profiles on three fiber types of skeletal muscle in guinea pigs and rabbits. *Biochemistry* 11: 2627 - 2733.
- Peters SE, Mulkey R, Rasmussen SA, Goslow GE Jr. (1984). Motor units of the primary ankle extensor muscles of the opossum (*Didelphis virginiana*): functional properties and fiber types. *J Morphol* 181 (3): 305 - 317.
- Petkó M. y Antal M. (2000). Propriospinal afferent and efferent connections of the lateral and medial areas of the dorsal horn (laminae I-IV) in the rat lumbar spinal cord. *J Comp Neurol*. 422(2): 312 - 325.

- Peyronnard J.M., Charron L.F., Lavoie J., Messier J.P. (1986).** Motor, sympathetic and sensory innervation of rat skeletal muscles. *Brain Res.* 373(1-2): 288 – 302.
- Phelps CJ, Sladek JR Jr. (1984).** Plasticity of catecholaminergic neurons in aged rat brain: reinnervation and functional recovery after axotomy. *Brain Res Bull.* Dec;13(6):727-36.
- Popesco P. (2003).** Atlas of anatomy of small laboratory animals Vol.II. Saunders Ltd.
- Powell T.P. y Cowan W.M. (1962).** An experimental study of the projection of the cochlea. *J Anat.* 96: 269 - 284.
- Puigdemívol-Sánchez A., Valero-Cabré A., Prats-Galino A., Navarro X., Molander C.. (2002).** On the use of fast blue, fluoro-gold and diamino yellow for retrograde tracing after peripheral nerve injury: uptake, fading, dye interactions, and toxicity. *J Neurosci Meth* 115: 115-127.
- Pullen A.H. (1977).** The distribution and relative sizes of three histochemical fibre types in the rat tibialis anterior muscle. *J Anat* 123: 1-19.
- Rafuse V.F., Pattullo M.C., Gordon T. (1997).** Innervation ratio and motor unit force in large muscles: a study of chronically stimulated cat medial gastrocnemius. *J Physiol.* 15;499: 809 - 823.
- Ranvier, L. (1873).** Propriétés et structures différentes des muscles rouges et des muscles blancs chez les lapins et chez les raies, *CR. Acad. Sci.* 77: 1030 – 1043.
- Redex B. (1952)** The cytoarchitectonic organization of the spinal cord in the cat. *J. Comp. Neurol.* 96: 415 - 496.
- Reed J.L., Pouget P., Qi H.X., Zhou Z., Bernard M.R., Burish M.J., Haitas J., Bonds A.B, Kaas J.H. (2008).** Widespread spatial integration in primary somatosensory cortex. *Proc Natl Acad Sci U S A.*22;105(29):10233 – 10237.
- Rekling J.C., Funk G.D., Bayliss D.A., Dong X.W., Feldman J.L. (2000).** Synaptic control of motoneuronal excitability. *Physiol Rev.* 80(2): 767 - 852.
- Steward R (1989).** .Relocalization of the dorsal protein from the cytoplasm to the nucleus correlates with its function. *Cell.* 1989 Dec 22;59(6):1179-88.
- Richmond F.J.R., Gladly R., Creasy J.L., Kitamura S., Smits E., Thomson D.B. (1994)** Efficacy of seven retrograde tracers, compared in multiple-labelling studies of feline motoneurons. *Journal of Neuroscience Methods* 53.
- Romanul F.C. (1964).** Distribution of capillaries in relation to oxidative metabolism of skeletal muscle fibre. *Nature* 18; 201: 307 - 308.

- Rosenzweig E.S., Courtine G., Jindrich D.L., Brock J.H., Ferguson A.R., Strand S.C., Nout Y.S., Roy R.R., Miller D.M., Beattie M.S., Havton L.A., Bresnahan J.C., Edgerton V.R., Tuszynski M.H. (2010). Extensive spontaneous plasticity of corticospinal projections after primate spinal cord injury. *Nat Neurosci.* 13(12):1505-10.
- Rossi F., Gianola S., Corvetti L. (2007). Regulation of intrinsic neuronal properties for axon growth and regeneration. *Prog Neurobiol.* 81(1): 1 - 28.
- Roy R.R., Bello M.A., Bouissou P., Edgerton V.R. (1987). Size and metabolic properties of fibers in rat fast-twitch muscles after hindlimb suspension. *J Appl Physiol.* 62 (6): 2348 - 2157.
- Roy R.R., Matsumoto A., Zhong H., Ishihara A., Edgerton V.R.. (2007). Rat alpha- and gamma-motoneuron soma size and succinate dehydrogenase activity are independent of neuromuscular activity level. *Muscle Nerve.* 36 (2): 234 - 241.
- Rubel E.W., Smith Z.D., Steward O. (1981). Sprouting in the avian brainstem auditory pathway: dependence on dendritic integrity. *J Comp Neurol.* 1;202(3): 397 – 414.
- Ryan J.M., Cushman J., Baier C.. (1997). Organization of forelimb motoneuron pools in two bat species (*Eptesicus fuscus* and *Myotis lucifugus*). *Acta Anat (Basel)* 158(2): 121 - 129.
- Ryan J.M., Cushman J., Jordan B., Samuels A., Frazer H., Baier C. (1998). Topographic Position of Forelimb Motoneuron Pools Is Conserved in Vertebrate Evolution. *Brain Behav Evol* 51: 90 - 99.
- Saad M., Dubuc R., Widmer C.G., Westberg K.G., Lund J.P. (1997). Anatomical organization of efferent neurons innervating various regions of the rabbit masseter muscle. *J Comp Neurol.* Jul 14;383(4):428-38.
- Saito M. (1986). Spatial distribution of motoneurons innervating the joint flexor and extensor muscles of the forelimb in the rat spinal cord. *Nippon Seikeigeka Gakkai Zasshi.* 60 (11): 1167 – 1174.
- Santo Neto H., Cloris de Carvalho V., Marques M.J. (1998). Estimation of the number and size of human flexor digiti minimi muscle motor unit using histological methods. *Muscle Nerve* 21(1):112 - 114.
- Santo Neto H., Marques M.J. (2008). Estimation of the number and size of motor units in intrinsic laryngeal muscles using morphometric methods. *Clin Anat* 21(4): 301 - 306.

- Schiaffino S, Gorza L, Sartore S, Saggin L, Vianello M, Gundersen K, Lomo T. (1989). Three myosin heavy chain isoforms in type 2 skeletal muscle fibers. *J Muscle Research and cell motility* 10: 197- 205.
- Schieber MH. (2007).Chapter 2 Comparative anatomy and physiology of the corticospinal system. *Handb Clin Neurol.* 2007;82:15-37.
- Schmitt A.B., Brook G.A., Buss A., Nacimient W., Noth J., Kreutzberg G.W. (1998). Dynamics of microglial activation in the spinal cord after cerebral infarction are revealed by expression of MHC class II antigen. *Neuropathol Appl Neurobiol.* ;24(3): 167 - 176.
- Scholle H. Ch., Schumann N.P., Biedermann F., Stegeman D. F., Grabme R., Roeleveld K., Schilling N., Fischer M.S. (2001) Spatiotemporal surface EMG characteristics from rat triceps brachii muscle during treadmill locomotion indicate selective recruitment of functionally distinct muscle regions. *Exp Brain Res.* 138: 26 - 36.
- Schrimsher G. y Reier P. (1992): Forelimb motor performance following cervical spinal cord contusion injury in the rat. *Exp. Neurol.* 117: 287 – 298.
- Schumann N.P, Biedermann F.HW., Kleine B.U., Stegeman D.F., Roeleveld K, Hackert R., Scholle H.Ch. (2002) Multi-channel EMG of the M triceps brachii in rats during treadmill locomotion. *Clin Neurophys* 113: 1142 - 1151.
- Scott J.G., Mendell L.M. (1976).Individual EPSPs produced by single triceps surae Ia afferent fibers in homonymous and heteronymous motoneurons.*J Neurophysiol.* 1976 Jul;39(4): 679 - 692.
- Segal M. (1992). choline enhances NMDA-evoked calcium rise in hippocampal neurons. *Brain Res* 31;587(1):83-7.
- Sherrington C.S. (1910). Flexion-reflex of the limb, crossed extension-reflex, and reflex stepping and standing. *J Physiol.* 1910 Apr 26; 40(1-2): 28 - 121.
- Shupliakov O., Ornung G., Brodin L., Ulfhake B., Ottersen O.P., Storm-Mathisen J., Cullheim S. (1993).Immunocytochemical localization of amino acid neurotransmitter candidates in the ventral horn of the cat spinal cord: a light microscopic study.*Exp Brain Res.* 96(3): 404 - 418
- Shupliakov O., Ornung G., Brodin L., Ulfhake B., Ottersen O.P., Storm-Mathisen J., Cullheim S. (1993) Immunocytochemical localization of amino acid neurotransmitter candidates in the ventral horn of the cat spinal cord: a light microscopic study. *Exp Brain Res.* 96(3): 404 - 18.



- Siebert JR, Middleton FA, Stelzner DJ. (2010). Long descending cervical propriospinal neurons differ from thoracic propriospinal neurons in response to low thoracic spinal injury. *BMC Neurosci.* Nov 23; 11: 148.
- Sokoloff AJ, Siegel SG, Cope TC. 1999. Recruitment order among motoneurons from different motor nuclei. *J Neurophysiol* 81(5):2485-2492.
- Somogyi J., Eysel U., Hamori J. (1987). A quantitative study of morphological reorganization following chronic optic deafferentation in the adult cat dorsal lateral geniculate nucleus. *J Comp Neurol.* Jan 15;255(3): 341 - 350.
- Song C.K., Enquist L.W., Bartness T.J. (2005). New developments in tracing neural circuits with herpesviruses. *Virus Res.*111(2):235-49.
- Steward R. (1999). Stereological methods for estimating the total number of neurons and synapses: issues of precision and bias. *Trends Neurosci.* Feb;22(2): 51 - 61.
- Stuart DG, Hamm TM, Vanden Noven S. (1988). Partitioning of monosynaptic Ia EPSP connections with motoneurons according to neuromuscular topography: generality and functional implications. *Prog Neurobiol* 30 (5): 437 - 447.
- Suzuki H., Oyanagi K., Takahashi H. (1995) Evidence for transneuronal degeneration in the spinal cord in man: a quantitative investigation of neurons in the intermediate zone after long-term amputation of the unilateral upper arm. *Acta Neuropathology* 89; 464-470.
- Swett J.E., Wikholm R.P., Blanks R.H., Swett A.L., Conley L.C. (1986) Motoneurons of the rat sciatic nerve. *Exp Neurol.* Jul;93(1) :227 -52.
- Szentkúti L., Bruns J. (1983). Motoneurons of *M. semitendinosus* in domestic and wild pigs. A horseradish peroxidase and cord-survey study. *Anat Embryol (Berl)* 167(2): 213 – 228.
- Tai Q., Palazzolo K., Mautes A., Nacimientó W., Kuhtz-Buschbeck J., Nacimientó A., Goshgarian H. (1997). Ultrastructural characteristics of glutamatergic and GABAergic terminals in cat lamina IX before and after spinal cord injury. *J. Spinal Cord. Med.* 20: 311 – 318.
- Terao S., Li M., Hashizume Y., Mitsuma., Sobue G. (1999) No transneuronal degeneration between human cortical motor neurons and spinal motor neurons *Journal of Neurology*, 246: 61 - 62.

- Terzis G., Georgiadis G., Vassiliadou E., Manta P. (2003). Relationship between shot put performance and triceps brachii fiber type composition and power production. *Eur J Appl Physiol* 90(1-2):10-5.
- Thomas C., Zaidner E., Calancie B., Broton J. y Bigland-Ritchie B. (1997). Muscle weakness, paralysis, and atrophy after human cervical spinal cord injury. *Exp. Neurol.* 148: 414 – 423.
- Thompson SW, Gerber G, Sivilotti LG, Woolf CJ. (1992). Long duration ventral root potentials in the neonatal rat spinal cord in vitro; the effects of ionotropic and metabotropic excitatory amino acid receptor antagonists. *Brain Res.* Nov 6;595(1): 87 - 97.
- Tiraihi T, Rezaie MJ. (2004) Synaptic lesions and synaptophysin distribution change in spinal motoneurons at early stages following sciatic nerve transection in neonatal rats. *Brain Res Dev Brain Res.* 2004 Jan 31;148(1): 97 - 103.
- Tötösy de Zepetnek JE, Zung HV, Erdebil S, Gordon T. 1992. Innervation ratio is an important determinant of force in normal and reinnervated rat tibialis anterior muscles. *J Neurophysiol.* 67(5): 1385-1403.
- Tresch M.C., Saltiel P., Bizzi E. (1999). The construction of movement by the spinal cord. *Nat Neurosci.* Feb;2 (2) : 162 - 167.
- Tseng G.F., Prince D.A. (1996). Structural and functional alterations in rat corticospinal neurons after axotomy. *Neurophysiol.* Jan;75(1): 248-67.
- Tubbs R.S., Salter E.G., Oakes W.J. (2006) Triceps brachii muscle demonstrating a fourth head. *Clin Anat.* 19 (7): 657 - 660.
- Van Gieson, I., *New York Med. J.*, 50:57-60, 1889.
- Vanderhorst VG, Holstege G. (1997). Organization of lumbosacral motoneuronal cell groups innervating hindlimb, pelvic floor, and axial muscles in the cat. *Comp Neurol.* May 26;382(1): 46 -7 6.
- Vanner S.J., Rose P.K. (1984). Dendritic distribution of motoneurons innervating the three heads of the trapezius muscle in the cat. *J comp neurol* 226: 96 - 110.
- Vinay L., Brocard F., Clarac F. (2000). Differential maturation of motoneurons innervating ankle flexor and extensor muscles in the neonatal rat. *Eur J Neurosci* 12 (12): 4562 - 4566.

- Von Mering F., Fischer M.S. (1999). Fibre type regionalization of forelimb muscles in two mammalian species, *Galea musteloides* (Rodentia, Caviidae) and *Tupaia belangeri* (Scandentia, Tupaiidae), with comments on postnatal myogenesis. *Zoomorphology*. 119: 117 - 126.
- Wachstein M., Meisel E. (1955). The distribution of histochemically demonstrable succinic dehydrogenase and of mitochondria in tongue and skeletal muscles. *J biophysic biochem cytol* 1(6): 483 - 488.
- Wada N., Sugita S., Kolblinger G. (1990). Spinal cord location of the motoneurons innervating the tail muscle of the cat. *J. Anat.* 173:101 - 107.
- Wang L.C., Kernell D. (2001a). Fibre type regionalisation in lower hindlimb muscles of rabbit, rat and mouse: a comparative study. *Journal of Anatomy*. 199: 631-643.
- Wang L.C., Kernell D. (2001b). Quantification of fibre type regionalisation: an analysis of lower hindlimb muscles in the rat. *J Anat* 198: 295- 308.
- Wang Y.J., Tseng G.F. (2004). Spinal axonal injury induces brief downregulation of ionotropic glutamate receptors and no stripping of synapses in cord-projection central neurons. *J Neurotrauma*. Nov;21(11):1624 - 1639.
- Watson J.C., Wilson A.M. (2007). Muscle architecture of biceps brachii, triceps brachii and supraspinatus in the horse. *Journal of Anatomy*. 210: 32 - 40.
- Weeks OI, English AW. (1987). Cat triceps surae motor nuclei are organized topologically. *Exp Neurol*. ;96(1): 163 - 177.
- Weidner N., Ner A., Salimi N., Tuszynski M. (2001). Spontaneous corticospinal axonal plasticity and functional recovery after adult central nervous system injury. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98: 3513 – 3518.
- Wells D.G., McKechnie B.A., Kelkar S., Fallon J.R. (1999). Neurotrophins regulate agrin-induced postsynaptic differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Feb 2; 96(3):1112 - 1117.
- Wells R. (2003). Spinal sensorimotor system Part II: Motoneurons and motorneuron pathways.
- West M.J., Gundersen H.J. (1990). Unbiased stereological estimation of the number of neurons in the human hippocampus. *J Comp Neurol*. Jun 1; 296(1): 1 - 2
- West, M.J. (1993). Regionally specific loss of Neurons in the aging human Hippocampus. *Neurobiology of Aging*, 14, 287 - 293.

- West, M.J., Slomianka, L. and Gundersen, H.J.G. (1991). Unbiased stereological estimation of the total number of neurons in the subdivisions of the rat hippocampus using the optical fractionator. *The Anatomical Record*, 231, 482-497.
- Westbury D.R. (1982). A comparison of the structures of alpha and gamma-spinal motoneurons of the cat. *J Physiol*. 325 : 79 - 91.
- Widmer C.G., English A.W., Morris-Wiman J.(2007) Developmental and Functional Considerations of Masseter Muscle Partitioning. *Arch Oral Biol*. 52(4): 305-308.
- Wiedenmann B., Franke W.W. (1985). Identification and localization of synaptophysin, an integral membrane glycoprotein of Mr 38,000 characteristic of presynaptic vesicles. *Cell*. 41(3):1017-28.
- Yakovenko S, Mushahwar V, VanderHorst V, Holstege G, Prochazka A. (2002). Spatiotemporal activation of lumbosacral motoneurons in the locomotor step cycle. *J Neurophysiol* 87 (3): 1542 - 1553.
- Zhang W., Pombal M.A., el Manira A., Grillner S. (1996). Rostrocaudal distribution of 5-HT innervation in the lamprey spinal cord and differential effects of 5-HT on fictive locomotion. *J Comp Neurol*. 14;374(2): 278 - 290.